

KAPITEL IV

WIEDERVERWENDUNG VON „BIOWASSER“, AZE: AEROBE ZYKLISCHE ENTKARBONISIERUNG - POLYACRYLAMIDE UNTERSTÜTZEN DAS AZE*

* Die Messungen der Parameter und der Wirkungsgrad der Anlagenkomponente AZE (Aerobe Zyklische Entkarbonisierung) stammen aus einer von mir in Viersen durchgeführten Studie (2006 und 2007). Verfahrenskonzeption, Anwendungsmöglichkeiten und Bewertung der Polyacrylamide beruhen auf Studien von Herrn Dr. Philipp Althöfer.

ZUSAMMENFASSUNG

In diesem Beitrag werden aktuelle Ergebnisse zur Entkarbonisierung und Wiederverwendung von „Biowässern“ aus der Papierherstellung vorgestellt. Ziel war es, Prozesswasserströme im Ablauf der biologischen Reinigungsstufen (Anaerobie, Belebtschlammverfahren und Nachklärung) im Hinblick auf ihre Wiederverwendbarkeit im Produktionsprozess zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Prozesswasserproben mit Hilfe des AZE-Verfahrens (Kandidat für die Beste Verfügbare Technik (BVT)) entkarbonisiert und aufbereitet - unterstützt durch PAM. Besonderes Augenmerk wurde auf die Parameter: Wasserhärte, Leitfähigkeit und Gehalt flüchtiger, organischer Säuren (FOS) gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass eine effiziente Entkarbonisierung an allen 3 Einsatzstellen erreicht wird. Das AZE-Verfahren wird dabei wirksam durch PAM unterstützt. Abhängig vom hergestellten Produkt und Ort der Integration des AZE-Verfahrens, ist die Wiederverwendung von entkarbonisiertem Prozesswasser als Teil- oder Gesamtstrom möglich. Im Falle von geschlossenen Wasserkreisläufen kann der Einsatz von Belebtschlammverfahren und somit die Bildung von organischem Überschussschlamm (Biomasse) vermieden werden. Die Verfahrenskombination AZE-PAM eröffnet neue Perspektiven im industriellen Wassermanagement und leistet einen entscheidenden Beitrag zum ökologischen Umgang mit der wertvollen Ressource Wasser - gleichzeitig können CO₂-Emissionen und Energiebedarf deutlich gesenkt werden. Aufgrund der Entwicklung des globalen Altpapier-Kreislaufs -mit sortenspezifischen Mineraliengehalten von bis zu 50 %- empfiehlt sich die Entkarbonisierung von „Biowasser“ als neuer EU-Standard und ist bereits im Vorfeld einzuplanen, bzw. nachzurüsten.

Wasseraufbereitung in der Papierindustrie

Wiederverwendung von Biowasser

Dr. rer. nat. Philipp ALTHÖFER; Dipl.-Biol. Grischa FEUERSÄNGER;
Dipl.-Ing. Johann SCHULTE

AZE – Aerobe zyklische Entkarbonisierung:
Polyacrylamide unterstützen Verfahren
der besten verfügbaren Technik.

Leser-Tipp

Die Teile 1 und 2 dieses Beitrags können Sie in wwt-Ausgabe 9/2005 und 9/2006, nachlesen. Nachfrage unter Tel.: 030/42151291, Frau Neumann oder E-Mail: petra.neumann@hussberlin.de.

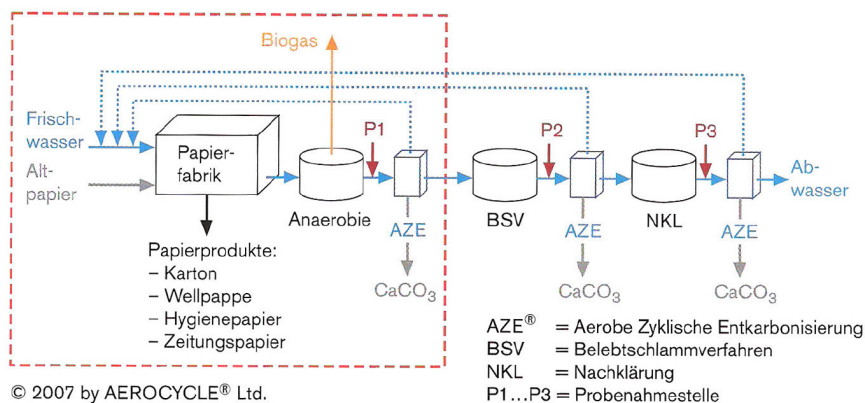
In diesem Beitrag werden aktuelle Ergebnisse zur Entkarbonisierung und Wiederverwendung von Biowässern aus der Papierherstellung vorgestellt. Von den Papierfabriken Propapier, SCA-Packaging und Weig-Karton zur Verfügung gestellte Prozesswasserproben wurden Ende März 2007 im Rahmen der Lehrveranstaltung „Biologische Abwasserreinigung – Technologie und Anwendung“ an der Universität zu Köln untersucht. Den Unternehmen sei an dieser Stelle für ihre Teilnahme am Projekt gedankt. Die Untersuchung wurde durch die Bereitstellung ausgewählter Flockungsmittel und das Verfahren der aeroben zyklischen Entkarbonisierung (AZE) von den Firmen Ashland GmbH Deutschland und Aerocycle Ltd. Deutschland unterstützt.

Ziel der Untersuchungen

Ziel war es, Prozesswasserströme im Ablauf der biologischen Reinigungsstufen (Anaerobie, Belebtschlammverfahren und Nachklärung) im Hinblick auf ihre Wiederverwendbarkeit im Produktionsprozess zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Prozesswasserproben mit Hilfe des AZE-Verfahrens – es gilt als beste verfügbare Technik (BVT) – entkarbonisiert und aufbereitet, unterstützt

durch Polyacrylamide (PAM). Besonderes Augenmerk wurde auf die Parameter Wasserhärte, Leitfähigkeit und Gehalt flüchtiger, organischer Säuren (FOS) gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass eine effiziente Entkarbonisierung an allen drei Einsatzstellen erreicht wird. Das AZE-Verfahren wird dabei wirksam durch PAM unterstützt. Abhängig vom hergestellten Produkt und vom Ort der Integration des AZE-Verfahrens, ist die Wiederverwendung von entkarbonisiertem Prozesswasser als Teil- oder Gesamtstrom möglich.

Im Fall von geschlossenen Wasserkreisläufen kann der Einsatz von Belebtschlammverfahren und somit die Bildung von organischem Überschussschlamm (Biomasse) vermieden werden. Die Verfahrenskombination AZE-PAM eröffnet neue Perspektiven im industriellen Wassermanagement und leistet einen entscheidenden Beitrag zum ökologischen Umgang mit der wertvollen Ressource Wasser. Gleichzeitig können CO₂-Emissionen und Energiebedarf deutlich gesenkt werden. Aufgrund der Entwicklung des globalen Altpapier-Kreislaufs mit sortenspezifischen Mineraliegehalten von bis zu 50 % empfiehlt



INTEGRATIONSMÖGLICHKEITEN: Entkarbonisierung mit dem AZE-Verfahren und Wiederverwendung von Biowasser

Bild 1

sich die Entkarbonisierung von Biowasser als neuer EU-Standard und ist bereits im Vorfeld einzuplanen bzw. nachzurüsten.

Aspekte des Enthärtungsverfahrens

Bisherige Bemühungen, Prozesswasser aus der Papierherstellung mit Hilfe kombinierter Anaerob- und Aerobtechnik bis zur Wiederverwendbarkeit aufzubereiten, scheiterten häufig an erhöhten anorganischen Frachten im gewonnenen Biowasser; diese Tendenz ist aufgrund der hohen AP-Recyclingquote steigend /1/. Bei den anorganischen Inhaltsstoffen handelt es sich vor allem um Calcium und andere Salze wie z.B. Chlorid, die zu Kalkablagerungen und Korrosion an Vakuum pumpen, Sieben und Spritzdüsen führen /2/.

Für die Herstellung von rund 375 Mio. t Papier wurden im Jahr 2005 weltweit etwa 30 Mio. t Mineralien (Füllstoffe und Streichfarben) verarbeitet. Damit ergibt sich ein durchschnittlicher Mineraliengehalt von etwa 8 % /3/, wobei sich sortenabhängig erhebliche Unterschiede ergeben. Die Hauptanwendung für Füll-

stoffe und Streichfarbenpigmente liegt im Bereich der graphischen Papiere (Schreib- und Druckpapiere. Produktion 2005 = 151 Mio. t). Diese können im Fall von mehrfach gestrichenen, holzfreien Papieren bis zu 50 % Mineralien enthalten /4/.

In anaeroben und aeroben Abwasserreinigungsanlagen wird Biomasse durch ausgefällttes CaCO_3 massiv verdrängt und durch Anlagerung inaktiviert. In der Folge wird an CaCO_3 gebundene und sedimentierte Biomasse dem aktiven Reinigungsprozess entzogen.

Zur Aufrechterhaltung eines stabilen Klärbetriebs sind daher häufige kostenintensive Reinigungsstillstände erforderlich, die sowohl die anaerobe- als auch aerobe Abwasserreinigungsanlage einschließlich sämtlicher verbindender Rohrleitungen und Einbauten wie z. B. Kühltürme, Gasabscheider, Belüftungseinrichtungen und Räumschilde betreffen. Die Betriebskosten biologischer Reinigungsstufen werden durch CaCO_3 -Ausfällungen um ca. 0,5 €/m³ erhöht und haben damit einen erheblichen Anteil an den Wasseraufbereitungskosten insgesamt /5/.

Entsprechend gering fällt die Biowasser-Wiederverwendungsquote von unter 20 % in der Papierindustrie aus. Dies ergab eine jüngst von der AEROCYCLE Ltd. bei neun deutschen Herstellern von Wellpappe, Karton und Hygienepapier durchgeführten Bestandsaufnahme im Rahmen des Forschungsprojekts „Enthärtung und Wiederverwendung biologisch aufbereiteter Prozesswässer aus der Papierfabrikation“. Gefördert wurde das Projekt durch die Ashland GmbH Deutschland und die Fa. Henkel KGaA, Fachbereich Ökologie, Düsseldorf. Da die Kosten für die Aufbereitung von Abwasser bei Direkteinleiterqualität zwischen 1,29 und 2,34 Euro liegen /6/, er-

Wirkungsgrad des AZE-Verfahrens bei Integration in den Ablauf der Anaerobstufe Tab. 1

Parameter	Eliminierung (%)
Ca	70 - 95
Cl	20 - 40
Leitfähigkeit	25 - 40
CSB	15 - 30
FOS	70 - 100
H ₂ S (Abluft)	> 99

langen Maßnahmen zur vollständigen Wiederverwendung des Biowassers aus der Papierfabrikation neue Bedeutung. Mit Hilfe des patentierten AZE-Verfahrens lässt sich biologisch vorgereinigtes Kreislaufwasser, unterstützt durch PAM, bei vergleichsweise niedrigen Betriebskosten auf Frischwasserniveau ent-harden.

Gleichzeitig werden geruchsbildende Substanzen wirksam eliminiert und die Effizienz nachgeschalteter biologischer Reinigungsstufen erhöht. Neben dem Klarwasser entsteht als einziges Reaktionsprodukt ein Karbonatschlamm, der in anderen Stoffkreisläufen – z. B. Baustoffindustrie – genutzt werden kann, so dass keine Entsorgungsprobleme entstehen.

Bewertung der Belebtschlammverfahren

Belebtschlammverfahren arbeiten in geschlossenen Wasserkreisläufen in Bezug auf die CSB-Eliminierung ineffizient und sind daher ökologisch und ökonomisch nicht vertretbar. Der Wirkungsgrad liegt laut Betriebsdaten der Betreiber nur zwischen 20 und 45 %. Auch in Bezug auf einen zukünftigen thermophilen Betrieb der Anaerobstufe, sind Belebtschlammverfahren ungeeignet, da ein wirtschaftlicher Sauerstoffeintrag bei höheren Temperaturen nicht möglich ist. Das vom Durchsatz abhängige Behältervolumen des AZE-Verfahrens ist verglichen mit Belebtschlammverfahren ca. 75 % geringer. Aufgrund der kostengünstigen Modulbauweise, die eine weitestgehende Vorfertigung erlaubt, können Volumenströme zwischen 10 und 450 m³/h entkarbonisiert werden. Die Anlage kann schrittweise dem tatsächlichen Bedarf angepasst werden.

Das Entkarbonisierungs-Verfahren

Integrationsmöglichkeiten und Wirkungsgrad

Bild 1 zeigt die Probenahmestellen (P1-P3), jeweils im Ablauf der biologischen Verfahrensstufen (Anaerobie (P1), Belebtschlammverfahren (P2) und Nachklärung (P3)).

Probenahmestelle P1: Der erreichbare Wirkungsgrad des AZE-Verfahrens bei Integration in den Ablauf der Anaerobstufe ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Die Integration des AZE-Verfahrens im Ablauf der Anaerobstufe hat den Vorteil, dass nachgeschaltete Behandlungsstufen vor hohen Ca-Frachten geschützt werden. Auf diese Weise können kostenintensive Reinigungsstillstände vermieden und die Effizienz gesteigert werden. Im

Falle des geschlossenen Wasserkreislaufs, können Belebtschlammverfahren und die damit verbundene Produktion von organischem Überschussschlamm vermieden werden. Eine Nachklärung entfällt.

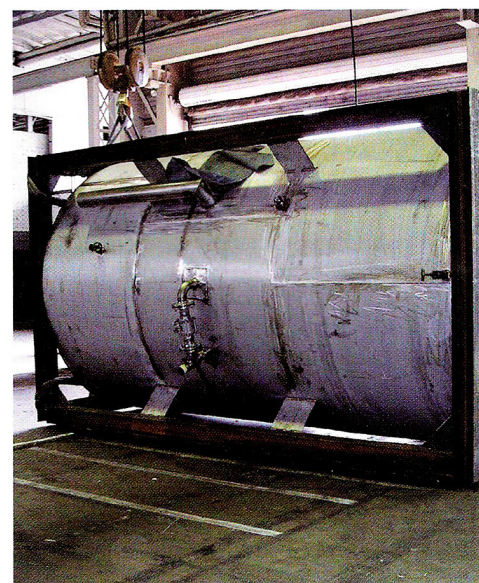
Die Verfahrenskombination Anaerobie/AZE (rot gestrichelter Rahmen Bild 1) bildet dann eine eigenständige Einheit und ermöglicht einen CSB-Gesamtwirkungsgrad von ca. 85 % bei simultaner Abluftreinigung /5/.

Abhängig von Produkt und Wiederverwendungszweck, kann das entkarbonisierte Biowasser als Teil- oder Gesamtstrom wiederverwendet werden.

Probenahmestellen P2/P3: In Bezug auf die anorganischen Parameter, ist der erreichbare Wirkungsgrad bei Integration des AZE-Verfahrens in den Ablauf des Belebtschlammverfahrens, bzw. der Nachklärung, den in Tabelle 1 dargestellten Werten vergleichbar. Die weitere CSB-Eliminierung fällt aufgrund des vorausgegangen biologischen Abbaus mit ca. 10 % geringer aus. Das entkarbonisierte Biowasser kann als Gesamtstrom wiederverwendet werden.

Die mit der Rückführung von entkarbonisiertem Biowasser verbundene pH-Wert-Anhebung führt langfristig zu einer Wirkungsgraderhöhung der Anaerobstufe.

Der alte Begriff „alkalische Schlammfäulung“ weist bereits darauf hin. Die Calcit-Lösekapazität ist herabgesetzt, verbunden mit niedrigeren Ca-Konzentrationen im Kreislaufwasser.



VORGEFERTIGTES AZE-MODUL: für einen Gesamtdurchsatz von 75 m³/h einsatzbereit

Bild 2

Effizienzsteigerung durch Polyacrylamide

Durch technische Weiterentwicklung und Feinabstimmung der Polyacrylamide (PAM) auf den Entkarbonisierungsprozess, konnte das Sedimentationsverhalten und die Resttrübung im gewonnenen Klarwasser deutlich verbessert und damit die Anlagengröße des AZE-Verfahrens um ca. 35 % reduziert werden. Flächen- und Investitionsbedarf fallen entsprechend geringer aus.

Anwendungsmöglichkeiten des AZE-Verfahrens, AP-verarbeitende Papierindustrie

Tab. 2

Branche	Einleitungsstatus	Integration Ablauf Anaerobstufe	Integration Ablauf Belebtschlammverf.	Integration Ablauf Nachklärung
Hygienepapierherstellung	GW			
	IE			
	DE	x		
Wellpappenherstellung	GW	x	x	x
	IE	x	x	x
	DE	x	x	x
Kartonherstellung	GE	x	x	x
	IE	x	x	x
	DE			
Zeitungspapierherstellung	GW			
	IE	x	x	
	DE			
Schreib- und Druckpapierherstellung	GW			
	IE	x	x	x
	DE	x	x	x

Legende:

GW = geschlossener Wasserkreislauf, IE = Indirekteinleiter, DE = Direkteinleiter; Integration des AZE-Verfahrens in den Ablauf der genannten Klärstufen Effiziente Ca-Eliminierung konnte bei Ca-Konzentrationen zwischen 240 und 6.200 mg/l im Zulauf zum AZE-Verfahren erreicht werden.

Eine Erhöhung von Leitfähigkeit oder CSB nach Dosierung von PAM konnte im Rahmen der Untersuchung nicht festgestellt werden, so dass von einem vollständigen Austrag mit dem Präzipitat ausgegangen werden kann.

Den Bedarf an Wasseraufbereitung durch Entkarbonisierung in der europäischen Papierindustrie stellt Tabelle 2 dar. Effiziente Ca-Eliminierung wird an den gekennzeichneten Orten der Integration erreicht. Die Angaben basieren auf über 1.000 Einzelwerten, die Analytik erfolgte durch die Betreiber.

Bewertung und Zertifizierung

Aufgrund des großen Einspar- und Umweltentlastungspotenzials, wird das patentierte AZE-Verfahren auf offiziellem Weg über das Umweltbundesamt (UBA), als nationale Koordinierungsstelle, in den aktuellen europäischen Revisionsprozess zur besten verfügbaren Technik (BVT) im Rahmen der biologischen Reinigung und Wiederverwendung von Prozesswässern aus der Altpapier verarbeitenden Papierindustrie einfließen.

Nach Gierse /7/ wird die beste verfügbare Technik zur Richtlinie für Anlagenge-

Klimaschutz

Im CaCO_3 festgelegtes CO_2 kann nicht in die Atmosphäre entweichen, so dass auch eine Entlastung in Bezug auf das klimarelevante Gas erreicht wird. Nutzern des AZE-Verfahrens können aufgrund des hohen Umweltentlastungspotentials entsprechende CO_2 -Zertifikate (Gutschriften) in Aussicht gestellt werden.

nehmigungen. Ältere bestehende Anlagen müssen ab dem 30. Oktober 2007 auf Grundlage der BVT betrieben werden /7/. Weiterhin durchläuft das vom DIHK für den deutschen Umweltpreis 2007 nominierte AZE-Verfahren derzeit eine Zertifizierungsphase: Certified Emission Reduction (CER) durch vom UN-Klimasekretariat akkreditierte Institute.

Indikationen

Indikationen für die Integration einer Entkarbonisierung sind:

- Ca-Gehalt im Prozesswasser (Zulauf Anaerobstufe) > 400 mg/l
- Produktverbesserung durch reduzierten Aschegehalt

- Frisch- und Abwassereinsparung durch Wiederverwendung des Biowassers. Der Kostenaufwand für die Aufbereitung von Frisch- und Abwasser liegt bei Direkt-einleiten zwischen 1,29 und 2,34 Euro/m³ /6/.

- Vermeidung von organischem Überschussschlamm, Verzicht auf Belebtschlammverfahren

- thermophile Prozesswasserbehandlung, Effizienzsteigerung biologischer Behandlungsstufen

- Reduzierung von CO_2 - und CH_4 -Emissionen, Reduzierung von Korrosionsrisiko und Calcitlösekapazität nach TwV

- Vermeidung von Ca-Konditionierung und organischen Säuren

- simultane Abluftreinigung.

Schlussfolgerung und Ausblick

Steigende Preise für die Bereitstellung von Energie, Wasser und Rohstoffen, machen die Verfügbarkeit effizienter Umwelttechnologien zu einem entscheidenden Wettbewerbsfaktor und aus Reststoffen wertvolle Recyclate. Zukunftsweisende Ziele, die den Bereich des Wassermanagements in der Papierindustrie betreffen, lauten:

- vollständige- und flächendeckende Nutzung des regenerativen Energieträgers Biogas aus der anaeroben Prozesswasserreinigung

- Betrieb der anaeroben Verfahrensstufen im für die Papierproduktion günstigen Temperaturbereich zwischen 40 und 55 °C, Verzicht auf Abwasserkühlung

- Vermeidung von organischem Überschussschlamm

- vollständige Wiederverwendung des gewonnenen Biowassers.

In diesem Beitrag konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der vorgenannten Verfahren eine Wiederverwendung von entkarbonisiertem Biowasser in Aussicht gestellt werden kann; dabei kann bereits das Recycling von entkarbonisierten Teilströmen (ab 10 m³/h) bei einem ROI von ca. 1 Jahr realisiert werden.

Aufgrund der Entwicklung des globalen Altpapier-Kreislaufs – mit sortenspezifischen Mineraliengehalten von bis zu 50 % – empfiehlt sich die Entkarbonisierung von Biowasser als neuer EU-Standard und ist bereits im Vorfeld einzuplanen, bzw., nachzurüsten.

Die Verfahrenskombination Anaerobie-AZE (rot gestrichelter Rahmen Bild 1) bildet eine eigenständige Einheit und ermöglicht einen CSB-Gesamtwirkungsgrad von ca. 85 %, bei simultaner Abluftreinigung. Energetisch besonders vorteilhaft ist dabei die Nutzung thermophiler Anaerobverfahren, z. B. das von AEROCYCLE entwickelte Metha Therm System (MTS), da eine Abwasserkühlung entfällt /6/. Im Fall des geschlossenen Wasserkreislaufs können Belebtschlammverfahren und die damit verbundene Produktion von organischem Überschussschlamm vermieden werden.

LITERATUR

- /1/ Althöfer, P.: Biotechnical Treatment Systems For Industrial Water Recycling And Reuse-Combined Anaerobic An Aerobic Treatment of Effluent from the Paper Industry. In: International Conference on Ecosystem Service and Sustainable Watershed Management Towards Flood Prevention, Pollution Control and Socio-Economic Development in North China, Peking, 2000
- /2/ Diedrich, K.; Hamm, U.; Knelissen, J.H.: Biologische Kreislaufwasserbehandlung in einer Papierfabrik mit geschlossenem Wasserkreislauf. In: Das Papier 6A: V153, 1997
- /3/ Kleemann, S.: Vortragsreihe Chemische Additive – funktionell unentbehrlich und ökologisch nützlich, Einleitung und Systematischer Ansatz, PTS-Symposium Chemische Technologie der Papierherstellung, 2006
- /4/ Gliese, T.: Dispergiemittel für Füllstoffe und Streichfarbenpigmente. Vortrag 17. PTS-CHT-Symposium 2006 München, Vortragsreihe des Zellcheming-Fachausschusses Chemische Additive (CHAD): Chemische Additive – funktionell unentbehrlich und ökologisch nützlich (Teil III)
- /5/ Althöfer, P.; Heimbürger, R.; Schiel, N.C.: PM6 in Würth: Palm setzt AZE-Verfahren ein. In: Allgemeine Papier Rundschau, Ausgabe 01/2004.
- /6/ Althöfer, P.; Arndt, H.; Feuersänger, G.: Too valuable for discharge-AZE Aerobic Cyclic Softening enables Decarbonation of biologically treated process water of paper production. Professional Papermaking (ppm) 2/2006
- /7/ Gierse, H.: Siemens im Zeichen von Green Solutions. In: Wochenblatt für Papierfabrikation 7/2007, S.338.

KONTAKT

Dr. rer. nat. Philipp ALTHÖFER

geschäftsführender Gesellschafter
AEROCYCLE Ltd. Deutschland,
Lehrbeauftragter Universität zu Köln
Postfach 320123 · 50795 Köln
Tel./Fax: 0221/2824583
E-Mail: philipp.althoefer@aerocycle.de
www.aerocycle.de

Dipl.-Biol. Grischa FEUERSÄNGER

Promotions-Stipendiat der Deutschen Bundesstiftung
Umwelt (DBU), UNIVERSITÄT ZU KÖLN,
Zoologisches Institut, Abt. Ökologie
Weyertal 119 · 50931 Köln
Tel.: 0221/470-3100 · Fax 0221/470-5932
E-Mail: grischa_f@yahoo.de

Dipl.-Ing. Johann SCHULTE

Sales Director Paper Central & South/East Europe,
Environmental and Process Solutions,
Ashland Deutschland GmbH
Füttingsweg 20 · 47805 Krefeld
Tel.: 02151/381309 · Fax: 02151/381066
E-Mail: mailto:jschulte@ashland.com
www.ashland.com

KAPITEL V

ZUM EINLEITEN ZU WERTVOLL: WIEDERVERWENDUNG VON „BIOWASSER“*

* Die theoretischen Einsatzmöglichkeiten thermal angepasster Protozoen wurden von mir in der Versuchsanlage Viersen 2006 untersucht. Die Konzeption der Versuchsanlage und gezielter Einsatz bestimmter Verfahrenskomponenten beruhen auf Studien von Herrn Dr. Philipp Althöfer.

ZUSAMMENFASSUNG

In einer Kooperationsstudie der Firma Aerocycle Ltd. mit der Universität zu Köln werden die Ergebnisse der Kohlenstoffeliminierung mit Hilfe der Aeroben Zyklischen Enthärtung gezeigt und ein Konzept der chemikalienarmen biologischen Prozesswasserreinigung, unterstützt durch thermophile Protozoen, vorgestellt. Die Zielsetzung der Studie gliedert sich in drei Fragestellungen:

1. Welches Einsparpotential besitzt der Einsatz von behandeltem Prozesswasser in der Produktion gegenüber dem Einsatz von Frischwasser?
2. Ist es möglich, durch den Einsatz der Aeroben Zyklischen Enthärtung im Ablauf der Nachklärung die Qualität des Prozesswassers zu verbessern?
3. Können thermal angepasste Protozoen die biologische, chemikalienarme Aufbereitung unterstützen?

Entsprechend der formulierten Zielsetzung werden Einsparpotential und Wirkungsgrade der Aeroben Zyklischen Enthärtung vorgestellt. Bei der Beprobung von thermalen Belebungsanlagen (bis zu 40°C) konnten zahlreiche thermal angepasste Protozoen nachgewiesen werden. Ziel ist es, das Prozesswasser bis zur Direkteinleiter-Qualität vor Ort in der Papierfabrik aufzubereiten, was neben der Umweltentlastung auch angesichts des Abwassergebührensatzes und der bisherigen Wasserkosten (Ab- und Frischwasser) erhebliche Entlastungen mit sich bringt. Neben der Entkarbonisierung und der Calcium-Eliminierung durch MTS (Metha Therm System) und AZE (Aerobe Zyklische Enthärtung ®) sollen in Zukunft thermophile Protozoen in einer erweiterten Trägerbiologie zum Einsatz kommen.

Zum Einleiten zu wertvoll Wiederverwendung von Biowasser

Dr. rer. nat. Philipp ALTHÖFER; Dipl.-Biol. Grisca FEUERSÄNGER

Inwieweit unterstützen thermophile Protozoen die chemikalienarme biologische Prozesswasserreinigung?

Das Verfahren der aeroben zyklischen Enthärtung (AZE) ermöglicht die Entkarbonisierung und Wiederverwendung von biologisch vollgereinigtem Wasser aus der Papierherstellung – thermophile Protozoen sollen die chemikalienarme biologische Prozesswasserreinigung unterstützen.

Wie in der wwt-Ausgabe 9/2005 /2/ angekündigt, werden in diesem Beitrag Ergebnisse aus Teil III der in Kooperation

mit der Universität zu Köln von AERO-CYCLE in der Papierindustrie durchgeführten Langzeitstudie vorgestellt. Die Untersuchungen zur Wiederverwendung von Biowasser werden bei Herstellern von Karton- und Wellpappenpapieren auf 100 % Altpapier (AP)-Basis durchgeführt.

Hierbei stehen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

1. Welches Einsparpotenzial bietet die Wiederverwendung von entkarbonisiertem Kreislaufwasser als Frischwasserersatz? Ein Wasserkosten-Überblick auf Basis von Betreiber-Angaben.

2. Lässt sich die Qualität biologisch vollgereinigten Wassers durch Einsatz der Aeroben Zyklischen Enthärtung (AZE) im Ablauf der Nachklärung verbessern? Ergänzend zu den vorausgegangenen Publikationen zur Prozesswasserentkarbonisierung werden hier erstmals Ergebnisse zum Einsatz des AZE-Verfahrens im Ablauf der Nachklärung (NKL) vorgestellt.

3. Können thermophile Protozoen zur chemikalienarmen, biologischen Prozesswasserreinigung in der Papierin-

Frage 1: Das Einsparpotenzial

Im Rahmen der in den letzten 5 Jahren von AERO-CYCLE in der deutschen Papierindustrie durchgeführten Forschungsarbeiten, fand in 12 Papierfabriken eine Bestandsaufnahme der Frisch- und Abwasserkosten statt. Sämtliche untersuchten Werke sind dem Bereich Verpackungspapiere aus 100 % AP zuzuordnen. Tabelle 1 gibt die von den Betreibern der Werke genannten Wasserkosten wieder. Bis auf einen Indirekteileiter, der nur über eine mechanische Entstoffung des Produktionsabwassers verfügt, sind alle Werke mit biologischen Klärstufen – bestehend aus Anaerob- und Belebtschlammverfahren – ausgestattet und leiten ihr Abwasser in den Vorfluter ein. Die für die biologische Abwasserreinigung genannten Kosten enthalten den Kapitaleinsatz und die Abschreibung für die Abwasserreinigungsanlage (ARA). Es ist anzumerken, dass der Überschussschlamm aus der biologischen Abwasserreinigung, wie in der Branche üblich, über das Produkt entsorgt wird. Daher ist davon auszugehen, dass außerbetriebliche Entsorgungswe-

ge die Gesamtkosten weiter erhöhen. Auffällig ist, dass in sämtlichen Werken eine Ca-Konditionierung (z. B. Polyphosphonate) eingesetzt wird, um die Ausfällung der aus dem AP eingetragenen Ca-Fracht als CaCO_3 zu verhindern. Neben der hohen Salzfracht (Korrosion), schränken Karbonate die Wiederverwendung von Biowasser ein, da sie zu unkontrollierten CaCO_3 -Ausfällungen führen und die Wirksamkeit von Hilfsmitteln der Papierherstellung herabsetzen.

Wasserkosten von 11 Direkteinleitern, nach Betreiber-Angaben in EUR/m ³						Tab. 1
	Frishwasser- entnahme/ -aufbereitung	Frishwasser- erwärmung/ Abwasser- kühlung	Kalzium- konditionierung	Biologische Abwasser- reinigung (anaerob/aerob)	Überschuss- schlamm- behandlung	Gesamt
Minimum	0,11	0,31	0,18	0,55	0,14	1,29
Maximum	0,17	0,43	0,34	1,18	0,22	2,34



AZE-VERFAHREN:

entfernt 8g CaCO_3 /10l aus dem Ablauf der Nachklärung

Bild 1

Klarwasserqualität nach Entkarbonisierung des Ablaufs NKL Tab. 2						
	Leitfähig- keit $\mu\text{S}/\text{cm}$	% Elimi- nierung	CSB mg/l	% Elimi- nierung	Ca mg/l	% Elimi- nierung
Ablauf NKL	3003	–	181	–	381	–
Ablauf AZE	2042	- 32	168	- 7	61	- 84

Ausgefällter Karbonatschlamm (trocken)/l NKL: 810 mg,
Glührückstand Karbonatschlamm: 92 %

Zusammenfassung: Die Aufwendungen für den Frisch- und Abwasserbereich inklusive Frischwassererwärmung und Abwasserkühlung liegen bei 1,3 bis 2,3 Euro/ m^3 . Der untersuchte Indirekteinleiter gibt einen Abwassergebührensatz von 2,66 Euro/ m^3 an. Damit stellen die Wasserkosten einen erheblichen Anteil der Produktionskosten, so dass bei einzuleitenden Volumenströmen von teilweise über 300 m^3/h , bereits eine Teilstromrückführung zu erheblichen Einsparungen führt.

Frage 2: Verbessert AZE die Qualität des gereinigten Wassers?

Das AZE-Verfahren wurde in früheren Publikationen bereits mehrfach beschrieben, so dass hier auf Veröffentlichungen in der wasserwirtschaft-wassertechnik, wwt, Ausgaben 4-5/2004, 9/2005 /1, 2/ und „Professional Papermaking“ (ppm), Ausgabe 2/2005 verwiesen wird. Weitere Informationen finden sich unter www.aerocycle.de.

Aufgrund des vorausgegangenen biologischen Abbaus, ist die Hydrogencarbonat-Konzentration im Ablauf der Anaerobstufe besonders hoch, daher wurde das AZE-Verfahren in bisherigen Betriebsversuchen ausschließlich dort in den Wasserkreislauf integriert. Die bei dieser Schaltung erreichten Ca-Elimi-

nierungsraten lagen in 11 Papierfabriken zwischen 70 und 90 %.

Erstmalig werden jetzt Ergebnisse zur Entkarbonisierung biologisch vollgereinigten Wassers, d. h. nach Durchlaufen von Anaerobie, Belebtschlammverfahren und Nachklärung, vorgestellt.

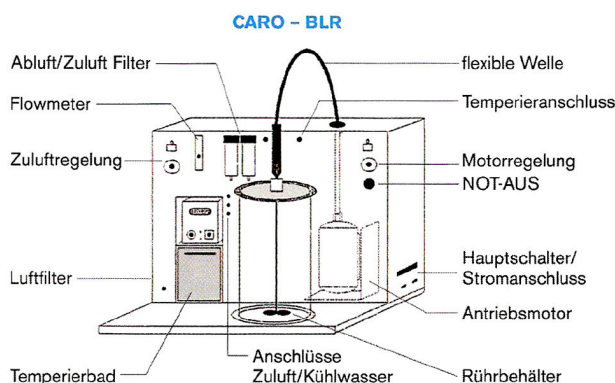
Die erreichte Ca-Ablauf-Konzentration bewegt sich mit 61 mg/l im Bereich des Frischwassers bzw. darunter, so dass bei Wiederverwendung nicht mit Kalkablagerungen zu rechnen ist. Bei einem zu entkarbonisierenden Volumenstrom von 150 m^3/h fallen bei diesem Beispiel

ca. 3 t CaCO_3 (trocken) pro Tag an. Die in Tabelle 2 dargestellte Klarwasserqualität kann als Teilstrom in die Produktion zurückgeführt werden und Frischwasser ersetzen. Die vorausgegangene biologische Reinigung im Belebtschlammverfahren bietet den Vorteil, dass der ausgefällte Karbonatschlamm (Bild 1) geruchsfrei ist, so dass auch hier eine innerbetriebliche Wiederverwendung möglich wird. Entsorgungsprobleme sind aufgrund des hohen Anorganikgehalts nicht zu erwarten.

Im CaCO_3 festgelegtes CO_2 kann nicht – wie im Wasser gelöstes CO_2 – in die Atmosphäre entweichen, dadurch kann auch eine Entlastung in Bezug auf das klimarelevante Gas erreicht werden. Aufgrund der im AZE-Verfahren integrierten Abluftreinigung und der vollständig geschlossenen Ausführung, arbeitet das Verfahren nahezu geruchs- und geräuschfrei und kann so auch problemlos in der Nähe von Wohngebieten eingesetzt werden.

Frage 3: Zur Reinigungsleistung thermophiler Protozoen

Wie in den zuvor beschriebenen Versuchsteilen setzt die Fa. AEROCYCLE ihre Kooperation mit der Universität zu Köln, hinsichtlich einer Einsatzmöglichkeit thermal angepasster Protozoen weiter fort. Dabei ist das Projekt an die von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) geförderte Promotion mit dem Titel: „Isolation, Charakterisierung und Einsatz thermophiler Protozoen für die umweltschonende Abwasseraufbereitung in Prozesswasser-Kreislaufsystemen“ gebunden. Wie im Titel bereits formuliert, sollen dabei thermal angepasste Protozoen als biologische Alternative zum Chemikalieneinsatz in der aeroben Abwasseraufbereitung zum Einsatz



IM BIOREAKTOR:
Kultivierung der Versuchsarten



Bild 2

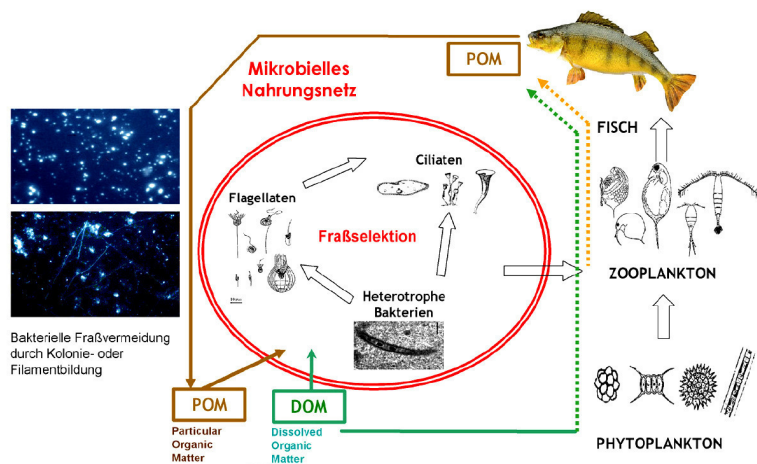


Bild 3

kommen. Die Papierindustrie wurde hierbei als Versuchsobjekt gewählt, da sie den Industriezweig darstellt, der u. a. das größte Abwasserkontingent stellt. In den vergangenen beiden Jahren konnten zwischen der Universität zu Köln und Unternehmen in dieser Branche Kontakte geknüpft werden. Die notwendigen Belebtschlamm-Proben wurden von

den Unternehmen Adolf Jass (Fulda), Kappa Zülpich-Papier (Zülpich), Moritz Weig (Mayen), Schoellershammer (Düren), Smurfit Europa Karton (Viersen) und WEPA (Marsberg) zur Verfügung gestellt. Dabei wurde das jeweilige Probenmaterial auf seine abiotischen und biotischen Faktoren untersucht und seine ökologischen Charakteristika anhand

dieser Parameter ermittelt. Mit Hilfe von LSM (Laser Scanning Microscopy), einem eigens dafür hergestellten Video-Mikroskop mit integrierter Kontrolleinheit sowie eines Bioreaktors/Fermenters und Chemostaten, wurden die Proben anschließend auf ihre protozoologische Zusammensetzung untersucht (Bild 2). Hierbei spielt der Faktor Temperatur eine wesentliche Rolle. Das aufbereitete Prozesswasser aus den unterschiedlichen Fabriken ist durch die zuvor durchlaufene Produktion auf über 40 °C aufgeheizt. Voruntersuchungen ergaben jedoch, dass sich auch unter solchen Bedingungen Protozoengruppen nachweisen ließen, die im Laufe des Betriebs der Anlage eine Adaptation auf Proteinbasis durchlaufen haben müssen. Grundstock für die Untersuchungen bildet das in Bild 3 aufgezeigte Modell. Es stellt das so genannte Nahrungsgewebe dar, dessen Komponente „Microbial Loop“, vom Freiland auf die Wasseraufbereitung übertragen wird. Es ist empirisch bereits seit langem bekannt, dass im Freiland ohne Predationsdruck von Protozoen kein entsprechender Makrowuchs der Bakterien in Form von Aus-

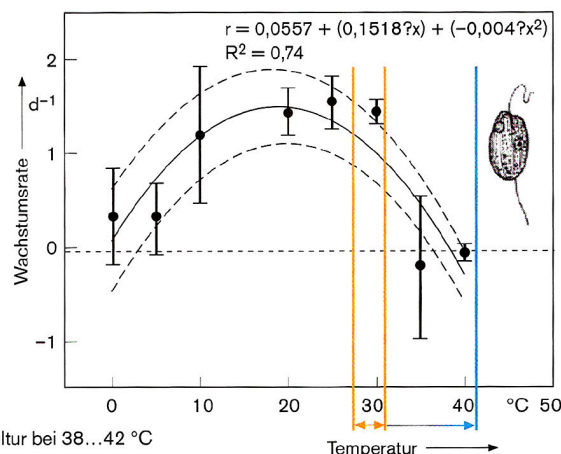
maximal tolerierbare Temperatur

entsprechend normaler
Freilandpopulationen

Entosiphon sulcatum	30 °C
Bodo designis	31 °C
Bodo saltans	31 °C
Chilomonas paramecium	29 °C
Spumella sp.	28 °C
Ochromonas sp.	28 °C

vorgefundene Arten im Werk
Kappa Papier Zülrich

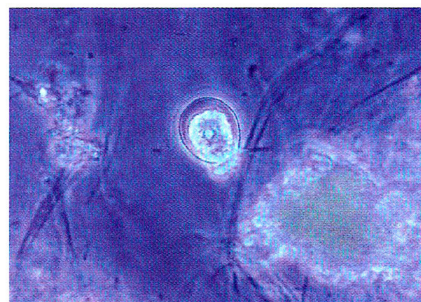
Allantion
Cryptodiffugia sp.
Vannella
Tetrahymena sp.
Holosticha pullaster
Tachysoma pelliellum



TEMPERATUR-TOLERANZ:

Vergleich von Freilandarten und Protozoen aus der Papierfabrik

flockung und Sedimentation stattfindet (/3/). Innerhalb der Kanalisation wurde dabei beobachtet, dass die Anwesenheit von Protozoen zu einer Aufhellung des Abwassers führten. Güde /4/ war mit seinem Paper „Grazing by Protozoa as Selection Factor for activated Sludge Bacteria“ (Microbial Ecology 5, pp. 225-237) als Erster auf die Bedeutung der Anwesenheit von bakteriovoren Predatoren für die Flockenbildung in Kläranlagen aufmerksam geworden. Protozoen üben einen Selektionsdruck auf die Bakterienpopulation im Nährschlamm aus. Protozoen können sowohl direkt als auch indirekt mit Bakterienpopulationen interagieren. Den stärksten Einfluss von Protozoen auf Bakterien stellt aber das „Grazing“ dar. In den Experimenten von Güde stellte sich heraus, dass die Morphologie der Hauptfaktor für die Selektion durch Protozoen-Grazing war. Filamente, Spiralförmigkeiten oder Flocken, die beobachtet wurden, überragten oftmals die Größe der Protozoen um ein Vielfaches. Sowohl im Freiland als auch im Labor konnte durch Jürgens und Matz /5/ nachgewiesen werden, dass das Resultat verstärkten Protozoen-Grazings Veränderungen in der genotypischen und phänotypischen Zusammensetzung in einer Bakteriengemeinschaft sind (beispielsweise durch den Wegfraß kleinerer Formen). Doch neben den morphologischen Eigenschaften gibt es auch andere Formen, die über den Erfolg von Ingestion und Digestion mitbestimmen (/5/). Motilität, Toxizität und physiochemische Wechselwirkungen zwischen Protozoen und Bakterien entscheiden ebenfalls über die Anfälligkeit für das Grazing. Letzteres erfolgt über



BIOCHEMISCHE MARKER:
z. B. heterotrophe Flagellaten
und Amöben

Bild 5



KANDIDATEN FÜR VERGLEICHENDE STUDIEN:
z. B. Ciliaten

Bild 6

die Ausscheidung von Botenstoffen, die ihrerseits die Etablierung von Makrowuchsformen unterstützen. In herkömmlichen Klärbetrieben werden bereits die mikroökologischen Effekte von Protozoen genutzt. Diese sollen in einer erweiterten Komponente in Zukunft zum Einsatz kommen. Zur Adaptation von Protozoen an hohe Temperaturen ist die Synthese von Hitzeschutz-Proteinen notwendig. HSP (Heat-Shock-Proteins) sind spezifische Proteine, die z. B. auch die Architektur

der menschlichen Haut schützen und Schäden reparieren. Sie neutralisieren z. B. interne Hautalterungsfaktoren (konstitutive HSP) und reparieren Schäden, die durch externe Aggressionen verursacht wurden (induktible HSP). Auch andere, kleinste Metazoen wie die Tardigrada (Bärtierchen) exprimieren HSP (/6/), um sich gegen die lebensfeindlichen Umweltbedingungen durchzusetzen. Die Stoffgruppe HSP 70 spielt eine entscheidende Rolle beim Zellschutz. Der Nachweis dieser Proteingruppen steht in direktem Zusammenhang mit der Einsatzfähigkeit der Protozoen bei Temperaturen > 40 °C.

Erste Ergebnisse

Morphologische Untersuchungen ergaben ein absolut differenziertes Toleranzspektrum der in den Fabriken vorgefundenen Arten gegenüber Hitze, Härte und pH-Wert des Abwassers. In Bild 4 werden die Unterschiede zu den Freilandarten deutlich.

An der Universität zu Köln isolierten wir Nanoprotisten, die sich über einen Zeitraum von 5 Jahren an ein Temperaturniveau von 42 °C adaptierten. Diese Funde bestätigen, dass Langzeitadaptationen möglich sind. Gegenwärtig arbeiten wir an der Etablierung von Kulturen der vorgefundenen Arten, darunter Vertreter der heterotrophen Flagellaten (e.g. Allantion), Amöben (e.g. Cryptodiffugia/, Vannella) und Ciliaten (e.g. Tetrahymena sp., Holosticha pullaster, Tachysoma pelliellum). Diese Arten (Bilder 5 und 6) sind potenzielle Kandidaten für vergleichende autökologische und morphologische Studien mit den an niedrigere Temperaturen angepassten Vertretern unter Verwendung von biochemischen Markern (HSP als Markerproteine, s. o.).

Zusammenfassung und Ausblick

Wie unter Frage 1. dargestellt, erfordert die Bereitstellung von Wasser für die Papierherstellung und dessen Reinigung bis zur Direkteinleiterqualität nach Angaben der Betreiber zwischen 1,3 und 2,3 EUR/m³. Der untersuchte Indirekteinleiter gibt einen Abwassergebührensatz von 2,66 EUR/m³ an. Damit stellen die Wasserkosten einen erheblichen Anteil der Produktionskosten, so dass bei einzuleitenden Volumenströmen von teilweise über 300 m³/h, bereits eine Teilstromrückführung zu erheblichen Einsparungen führt.

Die Wiederverwendung von biologisch vollgereinigtem Wasser wird in erster Linie durch hohe Salz- und Karbonatgehalte behindert. Durch Einsatz des pa-

tentierten AZE-Verfahrens im Ablauf der Nachklärung, kann die Klarwasserqualität deutlich verbessert werden. Im untersuchten Fall wurde die Ca-Fracht um 84 % und die Leitfähigkeit um 32 % gesenkt (Tabelle 2). Aufgrund der Geruchsfreiheit ist neben dem gewonnenen Klarwasser auch der Karbonatschlamm für eine innerbetriebliche Wiederverwendung geeignet. Entsorgungsprobleme sind nicht zu erwarten.

Erste Untersuchungsergebnisse zum Einsatz thermal angepasster Protozoen in der Reinigung von Abwässern aus der Papierindustrie sind viel versprechend. Es konnten verschiedene Arten aus Belebtschlämmen bei Temperaturen von > 40 °C nachgewiesen werden (Bild 4). Langfristiges Ziel ist die Integration thermal adaptierter Protozoen in die aerobe Nachreinigung. Dabei sollen die Protozoen als nicht chemisches, alternatives Flockungsmittel fungieren und gleichzeitig als Filter für organisches Restmaterial dienen.

LITERATUR

- /1/ Althöfer, P.; Apostolakou, L.: Wiederverwendung von Prozesswasser. In: wasserwirtschaft-wassertechnik, 4-5/2004, S. S 42 – S 44
- /2/ Althöfer, P.; Feuersänger, G.: Thermophile anaerobe Prozesswasserreinigung. In: wasserwirtschaft-wassertechnik, 9/2005, S. S 25 – S 30
- /3/ Curds, C.: The role of protozoa in activated-sludge process, Amer. Zool. 13, 161 – 169 (1973)
- /4/ Güde, H.: Grazing by Protozoa as Selection Factor for activated Sludge Bacteria. In: Microbial Ecology 5, pp. 225 – 237 (1979)
- /5/ Jürgens, K.; Matz, C.: Predation as shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria, Antonie van Leeuwenhoek 81, 413 – 434 (2002)
- /6/ Nelson, D. R. (1982): Developmental biology of the Tardigrada". In: Developmental Biology of Freshwater Invertebrates, pp. 363 – 398. Alan R. Liss Inc., New York.

KONTAKT

Dr. rer. nat. Philipp ALTHÖFER
AEROCYCLE Ltd. Deutschland
Postfach 320123
50795 Köln
Tel./Fax: 0221/2824583
www.aerocycle.de
E-Mail: philipp.althoefer@aerocycle.de

Dipl.-Biol. Grischa FEUERSÄNGER
UNIVERSITÄT ZU KÖLN
Zoologisches Institut, Abt. Ökologie
Weyertal 119
50931 Köln
Tel.: 0221/4703100
Fax: 0221/470593
E-Mail:grischa_f@yahoo.de

KAPITEL VI

REINIGUNGSLEISTUNGEN UND EINSATZMÖGLICHKEITEN THERMOTOLERANTER PROTOZOENARTEN IN DER THERMALEN BIOLOGISCHEN WASSERAUFBEREITUNG*

* Die theoretischen Einsatzmöglichkeiten von thermal angepassten Protozoen wurden von mir in der Versuchsanlage Viersen (2006-2007) und in einem Chemostatsystem (2007-2008) untersucht. Der Aufbau der Versuchsanlage in Viersen beruht auf einem Konzept von Herrn Dr. Philipp Althöfer zur kombinierten anaerob/aerob Behandlung. Entsprechend unseren neusten Untersuchungen handelt es sich bei dem heterotrophen Flagellaten *Histiona sp.* (*H. aroides ?thermophilus*, nicht *H. thermophila*) voraussichtlich um eine molekularbiologisch bisher noch nicht bestimmte Unterart von *Histiona aroides* (siehe Kapitel 2) mit höherer Temperaturtoleranz.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Aerobe Zyklische Enthärtungsverfahren (AZE®), das die Entkarbonisierung und Wiederverwendung von biologisch vorgereinigtem Wasser aus der Papierherstellung ermöglicht soll durch gezielten Einsatz thermophiler Protozoen unterstützt werden. Das mikrobielle Nahrungsnetzes dient als Forschungsansatz und soll auf eine an das AZE® angeschlossene, zusätzliche Reinigungsstufe übertragen werden. Die Versuchsarten *Histiona sp.*, *Oxytricha longa* und *Cyclidium glaucoma* wurden aus einer Belebungsanlage eines Indirekteinleiters bei einer Temperatur von $\leq 40^{\circ}\text{C}$ isoliert, kultiviert und sowohl morphologisch als auch molekularbiologisch bestimmt. Die Untersuchungen zum Einfluss auf die Bakteriengemeinschaft ergaben, dass unter Anwesenheit von *Histiona sp.* sich die Produktivität der einzeln vorliegenden Bakterien erhöhte und die Abundanz der Bakterienaggregate und die Abundanz der darin gebundenen Bakterien zunahm. Die gesteigerte Produktivität bedeutete eine erhöhte Verfügbarkeit der zum Abbau der organischen Belastung notwendigen Bakterien und die gesteigerte Abundanz der in den Aggregaten gebundenen Bakterien eine Erhöhung des sedimentierbaren organischen Materials. In den Untersuchungen zur CSB-Entwicklung wurde in 4 Chemostaten das Prozesswasser bei 40°C über einen Zeitraum von 144 Stunden mit Sauerstoff begast. Im zweiten Chemostaten fand eine Beimpfung mit dem Ciliaten *Oxytricha longa* statt, der dritte Chemostat beinhaltete eine Beimpfung mit *Cyclidium galucoma* und der vierte eine Kombination aus beiden. Bei der Einflussnahme auf den CSB zeigte sich *Oxytricha longa*, trotz unterlegener Reproduktionsrate, aber wesentlich größerer Biomasse, als effektivere Versuchsart. Den stärksten Einfluss auf den chemischen Sauerstoffbedarf nahm jedoch eine kombinierte Zugabe zum Prozesswasser.

Thermale biologische Wasseraufbereitung

Reinigungsleistung thermophiler Protozoenarten

Grischa Peter FEUERSÄNGER; Philipp ALTHÖFER; Hartmut ARNDT

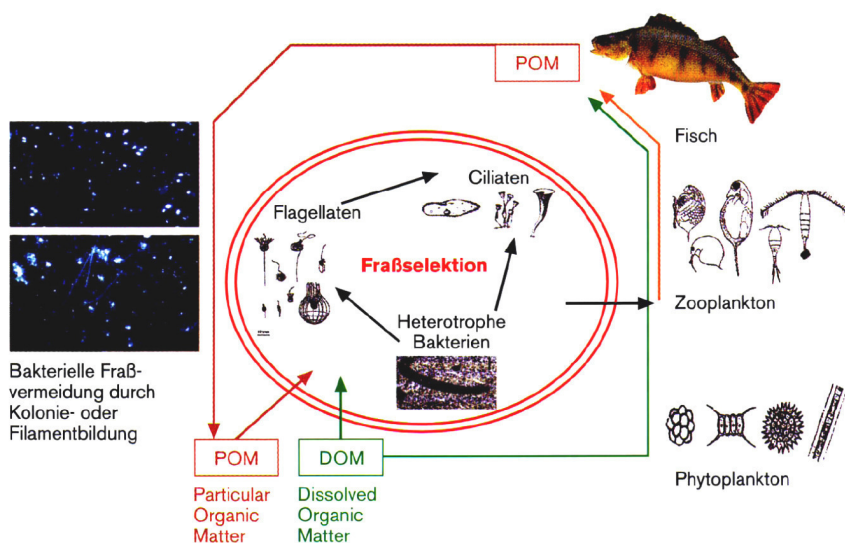
Lassen sich Protozoenkulturen in der thermalen Prozesswasseraufbereitung einsetzen?

Kann mit Hilfe von ausgewählten Protozoenarten in der thermalen Prozesswasseraufbereitung von Papierfabriken der CSB reduziert und organisches Material ausgefällt werden?

Die in den Artikeln „Thermophile anaerobe Prozesswasseraufbereitung (Teil 1)“ in wwt 9/2005 und „Wiederverwendung von Biowasser (Teil 2, Teil 3)“ in wwt 9/2006, 9/2007 beschriebene Zusammenarbeit zwischen der Universität zu Köln und der Fa. Aerocycle Ltd. wird mit diesem Beitrag fortgeführt.

Das Verfahren der aeroben zyklischen Entkarbonisierung (AZE®), das die Entkarbonisierung und Wiederverwendung von biologisch vorgereinigtem Wasser aus der Papierherstellung ermöglicht, soll in Zukunft durch thermophile Protozoen chemikalienarm unterstützt werden. Das Verfahren ist für den Deutschen Umweltpreis 2008 nominiert. Dieser zweite Teil wird im Rahmen eines Promotionsprojekts der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) gefördert.

Empirische Untersuchungen in natürlichen Habitaten ergaben, dass ohne die Anwesenheit von Bakterienkonsumenten – dies sind in der Regel Protozoen, also tierische Einzeller – die Ausbildung



DAS NAHRUNGSGEWEBE: Gebundener organischer Kohlenstoff wird durch Bakterienpopulationen assimiliert und in das Gewebe eingeschleust. Bild 1

von bakteriellen Makro-Strukturen nicht oder nur geringfügig stattfindet (/9/). Güde /10/ beschrieb in seinem Paper „Grazing by Protozoa as Selection Factor for activated Sludge Bacteria“ zum ersten Mal die Rolle von Protozoen-

gemeinschaften im Abwasser und ihren Effekt auf die Aggregatbildung der Bakterien in Wasseraufbereitungsanlagen. Dieses Konzept, gemeinsam mit dem Modell des mikrobiellen Nahrungsnetzes, wurde nun auf die thermophile biologische Wasseraufbereitung in Papierfabriken übertragen (Bild 1). Protozoen stellen einen strukturbildenden Faktor in der Bakterienzusammensetzung dar. Die Charakterisierung der Bakterien erfolgte durch eine in situ-Hybridisierung mit Oligonucleotiden. Die Identifikation innerhalb der anaeroben Reinigungsstufe, durchgeführt mit den spezifischen Sonden ARCH915 und EUB338, zeigten, dass Methanosarcina (MSAR1414) und Sulfat reduzierende Bakterien (SRB385) /1/ den Großteil der Gemeinschaft stellten. Diese Bakterien bilden in der anaeroben Stufe eine wichtige Grundlage für die Aufbereitung, zusätzlich dürfte ein Inoculum aus der Luft in das nachfolgende Belebtschlammssystem einge-

bracht werden (siehe Bild 2). Der Selektionsdruck auf die Bakteriengemeinschaft kann auf zwei Arten erfolgen. Fraßeffekte sollten den stärksten Effekt darstellen, wobei Bakterien in Aggregaten sowie anderen Makrostrukturen durch ihre Größe einem geringeren Fraßdruck durch Protozoen unterliegen (/7/, /12/, /18/). Daneben bestimmen andere Faktoren, wie Beweglichkeit, Toxizität und/oder Physiochemie der Bakterien (/12/) über die Ingestionsmöglichkeit. Bakterien können den Fraßdruck z. B. durch gesteigerte Produktivität (z. B. /13/) oder Aggregation reduzieren (/6/). Vor allem letztere Reaktionsweise wird in der klassischen Abwasserbehandlung zur Förderung des Sedimentationsverhaltens durch Flockenbildung im Belebtschlammbecken ausgenutzt. Ein Problem der Nutzung von Protozoen bei der Behandlung von temperierten Abwässern stellte bisher das Wissen um die geringe Temperaturtoleranz von Protozoen dar – in der Regel ertragen Protozoen maximal 30 bis 35 °C. Ein Screening von thermalen Wasseraufbereitungsanlagen ergab allerdings, dass eine erstaunliche Zahl von Protozoenarten auch in Abwässern mit Temperaturen von bis zu 40 °C lebensfähig ist (Feuersänger, Nitsche, Arndt; unveröffentlicht). Es wird angenommen, dass die Langzeitadaptation von Protozoen an hohe Temperaturen auf der Synthese von spezifischen Hitzeschockproteinen (HSPs) beruht (Germont, Philippe, Guyader, 1996). Die von uns in der thermalen Wasseraufbereitung nachgewiesenen heterotrophen Taxa umfassen sowohl Ciliaten/Wimperntiere, z. B. Vertreter der Colpodea Oligohymenophorea und Spirotrichea, als auch einige Flagellaten/Geißeltierchen und Amöbenarten. Aufgrund des permanenten Neueintrags von Nährstoffen durch die stetige Zufuhr von organisch belastetem Prozesswasser wird ein Nahrungsüberschuss gewährleistet. Die Wirkung von ausgewählten Protozoenarten auf den CSB am Beispiel der Ciliaten *Oxytricha longa* und *Cyclidium glaucoma* sowie der Effekt von Protozoen auf die Morphologie der Bakteriengemeinschaft am Beispiel des Flagellaten *Histiona aroides thermophila* werden



VERSUCHSORGANISMEN: *Histiona aroides thermophila* (links), *Oxytricha longa* (mitte), *Cyclidium glaucoma* (rechts)

Bild 2



DER TEMPERATURGRADIENTEN-BLOCK: Drei parallel geschaltete, voneinander isolierte Einheiten Bild 3

nachfolgend erstmalig für thermales Abwasser der Papierindustrie dargestellt.

Material und Methoden

Versuchsaufbau

Zur Versuchsdurchführung verwendeten wir einen Temperaturgradientenblock, der sich aus 3 parallel geschalteten, von einander isolierten Einheiten zusammensetzte (Bild 3). Die Temperatur jedes Blocks wurde über einen eigenen 2-Punkt-Regler vom Typ GIR 2000 Pt gesteuert. Der 2-Punkt-Regler besaß einen Eingang für einen Widerstand-Temperatursensor (Pt 100). Die durch den Platinfühler wahrgenommenen Schwankungen wurden an das Schaltelement übermittelt und über die ange-

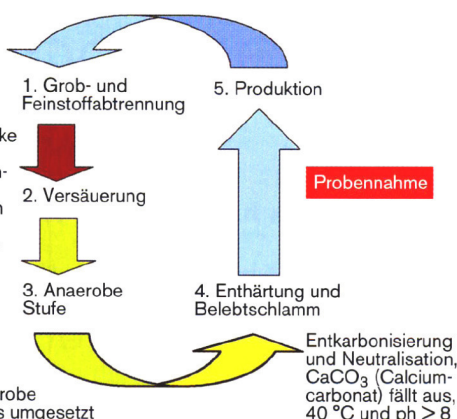
Rohabwasserbehandlung
Filter und Sedimentation, 40 °C und pH 6–7

Versäuernde Bakterien

Hauptsächlich Stärke wird unter Beteiligung von versäuernden Bakterien zu kurzkettigen Säuren abgebaut. Zugabe von Phosphorsäure und Harnstoff als Nährstoffe, 36 °C und pH 6

Methanbakterien

Essigsäure u. a. kurzkettige Säuren werden durch anaerobe Bakterien zu Biogas umgesetzt



DIE PROBENNAHME:

thermaler Behandlungszyklus, Versuchsorganismen *Histiona aroides thermophila*, *Oxytricha longa* und *Cyclidium glaucoma*

Bild 4

Lebensbedingungen der Isolate, Belebungsanlage Zülpich Tab. 1

Histiona aroides thermophila (7. 3. 2007):

Temperatur °C	O ₂ -Gehalt mg/l	pH	Leitfähigkeit µS	CSB, mg/l
40	1,3	8	1160	1100

Oxytricha longa und *Cyclidium glaucoma* (28.12.2007):

Temperatur °C	O ₂ -Gehalt mg/l	pH	Leitfähigkeit µS	CSB mg/l
39	1,7	7,9	1180	800

schlossenen Heizstäbe ausgeglichen. Die Temperatur ließ sich mit einer Exaktheit von 0,1 °C einstellen.

Versuchsorganismen und Probennahme

Für die Versuche verwendeten wir den Flagellaten *Histiona aroides thermophila*, eine neu entdeckte, thermotolerante Flagellaten-Art (Nitsche, Feuer-sänger, Arndt 2008) sowie die Ciliaten *Oxytricha longa* und *Cyclidium glaucoma*. Flagellaten und Ciliaten wurden aus der Belebtschlammanlage einer Papierfabrik in Zülpich isoliert. Deren Lebensbedingungen sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Das Probenmaterial wurde auf seine abiotischen- und biotischen Faktoren hin untersucht und die Protozoenarten mit Hilfe von licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen mor-

phologisch bestimmt. Diese Bestimmung wurde durch molekularbiologische Untersuchungen mit Hilfe einer Einzelzell-PCR verifiziert (Bild 2).

Analyse der Bakteriengemeinschaft

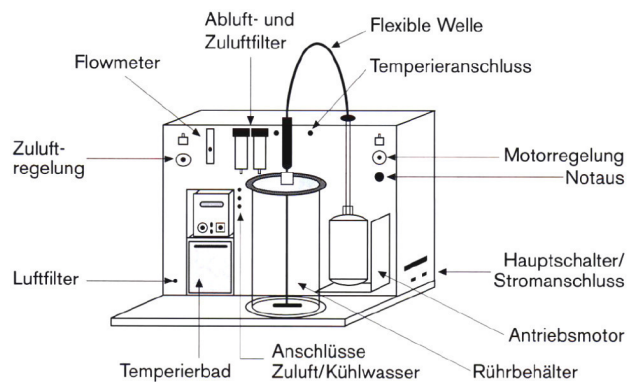
Die Reaktion der Bakteriengemeinschaft auf die Anwesenheit von Protozoen in Form von Flocken- oder Filamentbildung, die in der Wasseraufbereitung genutzt werden soll, wurde untersucht. In Zeitintervallen von 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden wurden Bakterienproben bei Inkubationen bei 36, 37, 38, 39 und 40 °C genommen und anschließend nach Färbung am Epifluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die Abundanz der Einzellzellen, der in Aggregaten zusammen gelagerten Zellen und die Anzahl der Bakterienaggregate mit einer Größe von $\geq 3 \mu\text{m}$, die auf Grund ihrer Größe eine Fraßbarriere darstellten, wurden bestimmt.

Die Bakterien wurden in Gewebekulturflaschen mit einem Volumen von 40 ml mit WC-Medium (/11/) und einem Weizen-Korn als Kohlenstofflieferant jeweils in Abwesenheit und Anwesenheit von Protozoen kultiviert. Als Untersuchungsorganismus wurde der Flagellat *Histiona aroides thermophila* ausgewählt. In regelmäßigen Abständen von 24 Stunden fixierten wir den Kulturflascheninhalt mit PBS-Medium, färbten ihn mit Propidiumiodid und zählten mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops die Zellzahl aus. Das Fixiermittel PBS setzte sich wie folgt zusammen. In einem Liter destilliertem Wasser befanden sich:

40 g NaCl; 1 g KCl; 7,1 g $\text{NaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 1 g KH_2PO_4 ; 10 ml 2 %iges Formol und 0,1-0,5g SDS (Pufferlösung, Natriumdodecylsulfat). Probe und Fixiermittelgemisch wurden in einem Verhältnis von 1:1 versetzt und 24 bis 48 Stunden bis zur Färbung und Auszählung gelagert. Jeweils 5 μl der fixierten Probe wurden mit 5 μl Färbungsmittel (Propidiumiodid) angereichert und mit der „Frame-Spotting“-Methode auf Objektträgern ausgewertet. Dazu wurden die präparierten Objektträger eine Stunde lang in einer Vakuumpumpe bei einem Druck von 800 mbar getrocknet. Die Präparation wurde im Dunkeln durchgeführt, um Überschussreaktionen des Propidiumiodids und eine überstarke Hintergrundfärbung zu vermeiden. Wir gaben erneut 5 μl Färbemittel in die Verstärkungsringe und setzten die Objektträger erneut für 15 – 20 min in der Vakuumpumpe einem Druck von 800 mbar aus. Anschließend wurde eine geringe Menge Immersionsöl beigefügt und die Probe mit einem Deckglas abgedeckt.

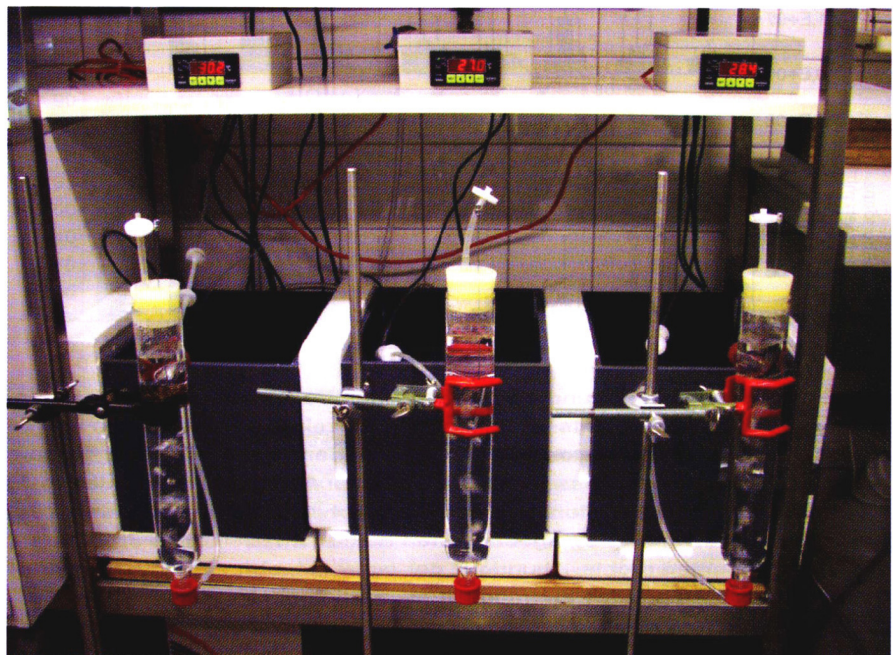
Überführung ausgewählter Protozoenarten in eine Versuchsanlage

Vier Chemostate enthielten anaerob vorgereinigtes Prozesswasser aus der ortsansässigen Papierfabrik in Zülpich (Bilder 4 und 5). Neben dem Reaktionsgefäß, das über einen sterilen Zugang zur Animpfung und eine Abluftfilterung verfügte, wurde das Medium mit Sauerstoff begast und durchmischt. Bei einem Reaktionsvolumen von 500 ml konnte auf die Installation eines Rührwerkes verzichtet werden. Über eine Laufzeit



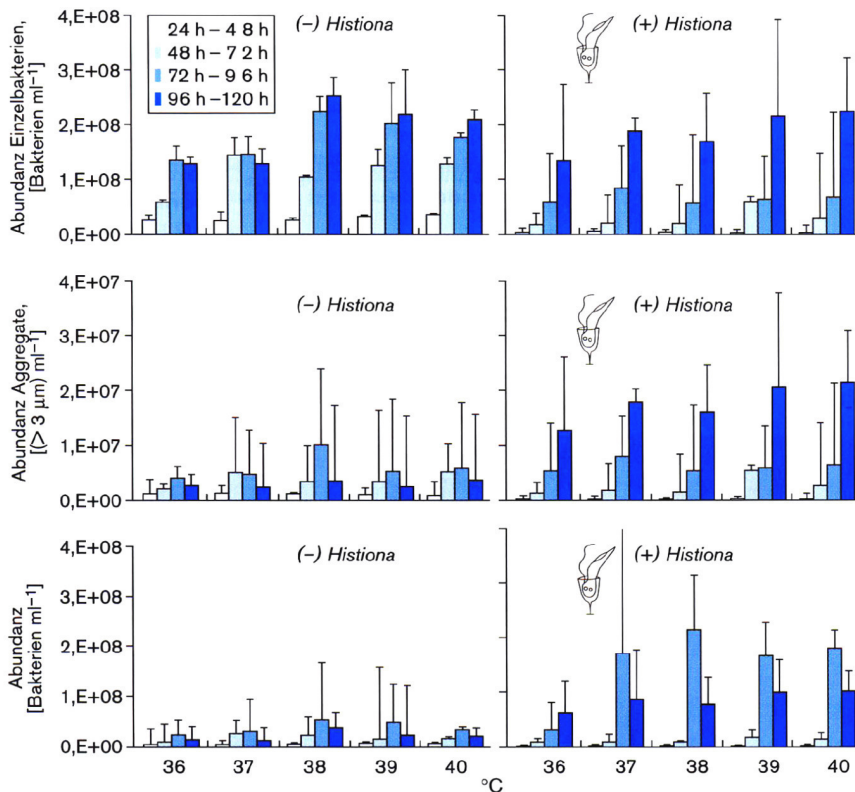
DER VERWENDETE BIOREAKTOR: thermophile Protozoenarten, CARO-BLR Fermenter zur Kultivierung von Histiona, Oxytricha und Cyclidium

Bild 5



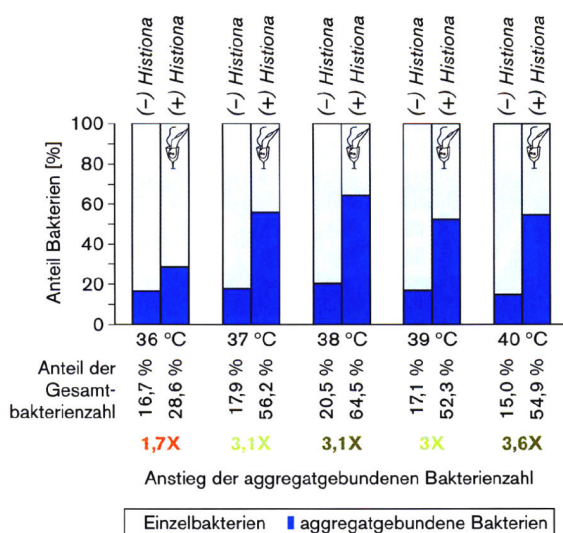
DAS CHEMOSTATSYSTEM: drei Chemostate mit gefilterter Luftzufuhr

Bild 6



ERGEBNIS oben links: Abundanz der einzelnen Bakterienzellen ohne Prädatorenanwesenheit; oben rechts: Abundanz der Einzelzellen mit *Histonarodites thermophila* als Prädatoren; mitte links: Abundanz der Bakterienaggregate (> 3 µm) ohne Prädatorenanwesenheit; mitte rechts: Abundanz der Bakterienaggregate (> 3 µm) mit *Histonarodites thermophila* als Prädatoren. unten links: Abundanz der aggregatgebundenen Bakterienzellen ohne Prädatorenanwesenheit; unten rechts: Abundanz der aggregatgebundenen Bakterienzellen mit *Histonarodites thermophila* als Prädatoren.

Bild 7



VERGLEICH DER ANTEILE: von „aggregatgebundenen Bakterien“

Bild 8

von 5 Tagen wurde eine Anaerobprobe durchmischt und mit Sauerstoff begast. Entsprechend dem Messwert der aeroben Aufbereitung in der Belebtschlammanlage, wurde eine Temperatur von 40 °C eingestellt. Parallel zur Kontrolle ohne Protozoen wurden drei wei-

tere Anaerobproben ebenfalls unter Sauerstoffzufuhr mit den Versuchsarten *Cyclidium glaucoma* und *Oxytricha longa* besetzt. Aufgrund der hohen Wachstumsraten und den kurzen Generationszeiten (Feuersänger, Nitsche, Arndt, eingereicht) entschieden wir uns bei den

vorgegebenen Temperaturen für diese beiden Arten. Der Inhalt jedes Chemo- staten setzte sich aus 400 ml der Anaerobprobe und 100 ml WC-Medium (/11/) mit Protozoenkulturen zusammen, wobei in der Kontrolle protozoenfrei gefiltertes WC-Medium aus den Kulturen verwendet wurde (Sartorius Nitrat Filterpapier, 1,2 µm Porengröße), um gleiche Bakterieninokula in allen Versuchsansätzen zu gewährleisten. Die Startkonzentration der Protozoendichte in den Ansätzen mit Protozoen betrug etwa 60 Individuen pro ml (Bild 6).

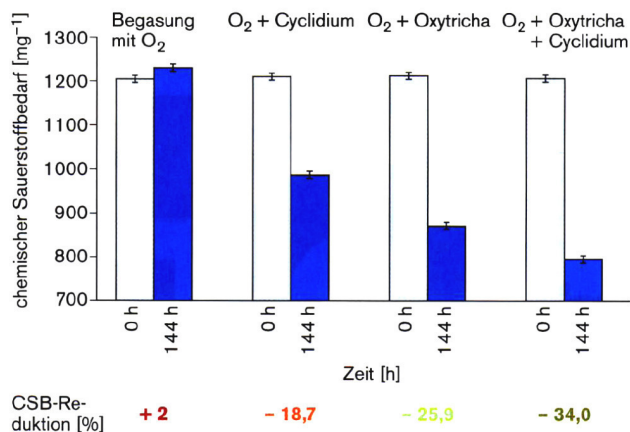
Einfluss auf die CSB-Entwicklung

Als chemisches Oxidationsmittel wurde Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) verwendet – DIN 38 409-H41, Ausgabe Dezember 1980. Die biologisch leicht und schwer abbaubaren aber auch die biologisch nicht abbaubaren organischen Stoffe oxidierten durch das Kaliumdichromat zu Kohlendioxid. Einige anorganische Verbindungen wie z. B. Iodid, Nitrit und bestimmte Schwefelverbindungen oxidierten jedoch ebenfalls. Aus dem Kaliumdichromatverbrauch konnte dann auf den chemischen Sauerstoffbedarf (CSB) geschlossen werden. In einem Intervall von 24 Stunden wurde parallel der CSB mittels eines kombinierten Küvetten-Fotometertests ermittelt und die Ergebnisse verglichen, um den Bakterienumsatz und die Flockungswirkung der ausgewählten Arten sichtbar zu machen. Hierzu wurde das C99 Multiparameter-Bench-Photometer der Firma Hanna und das dazugehörige CSB-MR-Reagenz (HI 93754B-25 MR) verwendet. Das Reagenz erfasste ein CSB-Spektrum von 0 bis 1500 mg/l und musste aufgrund der Lichtempfindlichkeit dunkel gelagert werden. 2 ml der anaerob behandelten Abwasserprobe wurden einer Testküvette hinzu gegeben und für 2 Stunden in einem Heizofen bei einer Temperatur von 150 °C unter der Anwesenheit von Kaliumdichromat oxidiert. Dabei reduzierten oxidierbare organische Komplexverbindungen die Dichromationen (Kaliumdichromat, orange Färbung) zu Chromionen (grüne Färbung). Es darf zur Erhitzung auf die erforderlichen 150 °C keine Mikrowelle benutzt werden, da diese zur Bildung von explosiven Gasgemischen in den Küvetten führt. Im Anschluss an die Beheizung wurden die Küvetten auf 120 °C abgekühlt, erneut durchmischt und dann auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Die Proben durften nach dieser Behandlung nicht mehr durchmischt werden. Der Versuchsansatz wurde mit den Abwasserproben ohne und mit Pro-

tozoenbeimpfung in je 10 Parallelen durchgeführt. Von einer Blindprobe ausgehend, wurde anschließend der Lichtstrahlbrechungsindex der nicht beimpften und der mit Protozoen beimpften Abwasserproben und somit die Konzentration der oxidierbaren organischen Verbindungen in mg/l ermittelt. Die Ursprungsprobe des anaeroben Prozesswassers wies die in Tabelle 2 erfassten Charakteristika auf.

Molekularbiologische Charakterisierung der Protozoenarten

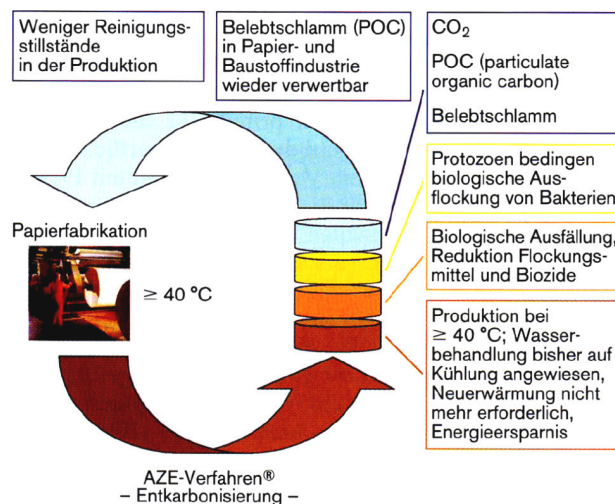
Einzelzellen aus klonalen Kulturen wurden unter Einsatz eines Mikromanipulators isoliert und eine PCR (Polymerase Chain Reaction) durchgeführt (Nitsche, Feuersänger, Arndt; eingereicht). Die Zellen wurden in sterilisiertem Wasser bei -20 °C gefroren (3 Stunden). Folgende Primer amplifizierten die kleine ribosomale Untereinheit (SSU rDNA-Fragment): 18SFor (AACCTGGTTG-ATC-CTGCCAGT), und 18SRev-Ch (CGTAACAAGGTTTCC-GTAGGT), Konzentration 1.6 nM. Zur Reamplifikation wurden die Primer 18S-82For (GAAACTGCGAATGGCTC) und 18SRev-1 (CGTAACAAGGTTTCCG-TAGGT) ausgewählt. Zur Aufreinigung der Produkte wurde das E.Z.N.A. Cycle-Pure-Kit (Pqlab, Erlangen, Germany) verwendet. Big Dye 3.1 Restriktionsenzyme sequenzierten die rDNA nach der Anleitung von Applied Biosystems, Erlangen, Germany. Forward Primer für die Sequenzierung waren 18S-82F, 590F, 1280F, Reverse Primer 600R, 1300R und 18SRev-1. DNA-Bruchstücke wurden manuell in so genannten „Overlaps“ zusammengefügt. Mit ClustalX (Thompson et al. 1996) führten wir den Sequenzabgleich und mit BioEdit Sequence Alignment Editor® (Hall



ENTWICKLUNG DES CHEMISCHEN SAUERSTOFFBEDARFS (CSB): unter verschiedenen Behandlungsansätzen, Ansatz 1: Belüftung mit Sauerstoff; Ansatz 2: Belüftung mit Sauerstoff und Zugabe von *Cyclidium glaucoma*; Ansatz 3: Belüftung mit Sauerstoff und Zugabe von *Oxytricha longa*; Ansatz 4: Kombinierte Behandlung mit Sauerstoff und beiden Ciliatenarten.

Bild 9

Bedingungen in der Anaerobstufe					Tab. 2
Temperatur °C	O ₂ -Gehal, mg/l	pH	Leitfähigkeit µS	CSB	
40	0	6,8	626	1602	



VORTEILE:
thermophile biologische Behandlung mit Protozoen

Bild 10

einer Behandlungsdauer von 144 Stunden die Wirkungsgrade nach Bild 9. Die beiden Ciliatenarten zeigten in vorangegangenen Untersuchungen eine hohe Temperaturtoleranz sowie entsprechende Wachstumsraten bei Temperaturen bis zu 40 °C und darüber hinaus (Feuersänger, Arndt 2008; eingereicht). Der Besatz mit *Oxytricha longa* führte über einen Zeitraum von 144 Stunden zu einem CSB-Abbau von 25,9 % im Vergleich zum Startwert und zeigte von beiden Ciliatenarten die stärkste Wirkung auf die Reinigungsleistung (Bild 9, Ansatz 3). Der Grund hierfür liegt im Verhältnis von Reproduktion, Biomasse und Stoffumsatz. *Cyclidium glaucoma* erreichte eine Erhöhung des Abbaus um 18,7 % (Bild 9, Ansatz 2). Ein kombinierter Besatz mit beiden Protozoenarten führte mit 34 % zur stärksten Verringerung des ursprünglichen CSB, was auf mögliche spezifische Reaktionen unterschiedlicher, koexistierender Bakterienstämme zurückzuführen ist (Bild 9, Ansatz 4).

Molekularbiologische Charakterisierung der eingesetzten Protozoenarten

Die Sequenzierung der 18S rDNA ergab deutliche Abweichungen der *Histiona*-Isolate aus Züllich und Düren zu Isolaten von *Histiona aroides* aus dem Freiland. Wir nehmen an, dass es sich hierbei um eine hitzeadaptierte neue Art (*Histiona aroides thermophila*, vgl. Nitsche et al., eingereicht) handelt. Die beiden Ciliatenarten, *Oxytricha longa* und *Cyclidium glaucoma*, konnten durch Abgleich der 18S rDNA Sequenzen mit den jeweiligen Daten aus der Genbank eindeutig identifiziert werden (Bild 5). Zumindest bezüglich der 18S rDNA ergaben sich keine Unterschiede zu den Freilandisolaten, allerdings sagt dieser Befund nichts darüber aus, inwieweit bereits eine genetisch fixierte Hitzetoleranz vorliegt (Feuersänger et al., eingereicht).

Ausblick

Es sind Projekte in Planung, die den gezielten Einsatz von Protozoenkulturen in der biologischen Kreislaufwasserreinigung vorsehen. Das patentierte Verfahren der Aeroben Zyklischen Entkarbonisierung (AZE)[®] kann bei

sehr hohen Ansprüchen an die Klarwasserqualität um eine nachgeschaltete Komponente erweitert werden. Der nachgewiesene Flockungseffekt auf die Bakteriengemeinschaften und die CSB-Elimination durch die thermophilen Protozoenarten enthalten zwei wesentliche Vorteile:

1. Das Prozesswasser bedarf zur biologischen Behandlung nicht, wie bisher üblich, einer Kühlung – die Produktion in der Papierindustrie läuft bei Temperaturen von mehr als 40 °C ab, somit wird Energie für eine erneute Beheizung eingespart. Die Temperatur für optimale

bakterielle Umsatzraten in der anaeroben Behandlungsstufe (*Methanosarcina*, MSAR1414) und Sulfat reduzierende Bakterien, SRB385) liegt ebenfalls in diesem Bereich. Eine thermale biologische Behandlung führt neben den massiven Energieeinsparungen auch zur Kosteneinsparung durch den Wegfall von Kühltürmen.

2. Die Ausflockung des organischen Materials findet auf biologischem Wege statt – heute geschieht dies regelmäßig durch Flockungsmittel, die zusätzlich in das System eingebracht werden müssen. Bakterien die sich im Leitungssystem

befinden, wurden bisher durch den Einsatz von Bioziden wie Halogenverbindungen abgetötet, die dem Wasserkreislauf kontinuierlich oder in regelmäßigen Abständen beigefügt werden und eine enorme Belastung darstellen (Bild 10). Wie die Ergebnisse in der CSB-Entwicklung ebenfalls gezeigt haben, hatte die Kombination der Arten *Oxytricha longa* und *Cyclidium glaucoma* den stärksten Einfluss auf die Reinigungsleistung. Es sind Folgeuntersuchungen zur optimalen Zusammensetzung und Aufbau der zusätzlichen Reinigungsstufe geplant. Wesentlicher Aspekt ist dabei die Entwicklung eines Auffangbeckens, das sowohl optimale Besiedlungsflächen für die Protozoen, als auch eine einfache Abscheidung sedimentierten organischen Materials gewährleistet (Bild 11).

Der Überschuss von partikulärem organischem Material (POM) lässt sich problemlos in der Baustoffindustrie als Rohstoff wieder verwerten. Die Qualitätsverbesserung des Prozesswassers führt zu einer Verringerung der Reinigungsstillstände bei gesteigerter Produktqualität (Bild 10).

KONTAKT

Dr. rer. nat. Philip ALTHÖFER
geschäftsführender Gesellschafter
 AEROCYCLE Ltd. Deutschland
 Lehrbeauftragter Universität Köln
 Postfach 320123
 50795 Köln
 Tel./Fax: 0221/2824583
 E-Mail: philipp.althoefer@aerocycle.de
www.aerocycle.de

Dipl.-Biol. Grisca Peter FEUERSÄNGER

Promotions-Stipendiat der
 Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU),
 Universität zu Köln, Zoologisches Institut, Abt. Ökologie
 Weyertal 119, 50931 Köln
 Tel.: 0221/470-3100
 Fax: 0221/470-5932
 E-Mail: grischaft@yahoo.de

LITERATUR

- /1/ Althöfer, P. (2002): Enthärtung und Wiederverwendung biologisch aufbereiteter Kreislaufwässer in Papierfabriken. Inaugural Dissertation, University of Cologne
- /2/ Althöfer, P.; Feuersänger, G.-P. (2005): Thermophile Anaerobe Circuit Water Treatment with Integrated Softening AZE®. Professional Papermaking 2, 56-60
- /3/ Althöfer, P.; Feuersänger, G.-P. (2005): Thermophile anaerobe Kreislaufwasserbehandlung mit integrierter Enthärtung AZE®. In: wasserwirtschaft-wassertechnik 9, 25-30
- /4/ Arregui, L.; Serrano, S.; Linares, M.; Perez-Zu, B.; Guinea A. (2007): Ciliate contribution to bioaggregation: laboratory assays with axenic cultures of *Tetrahymena thermophila*. International Microbiology 10, 91-96
- /5/ Baumgartner, M.; Yapi, A.; Groebner-Feirerra, R.; Stetter, K.-O. (2003): Cultivation and properties of *Echinamoeba thermarum* n. sp. an extreme thermophilic amoeba thriving in hot springs. Extremophiles 7, 267-274
- /6/ Berleman, J.; Kirby, J. R. (2007): Multicellulare Development in *Myxococcus xanthus* Is Stimulated by Predator-Prey Interactions. Journal of Bacteriology 189, 5675-5682
- /7/ Boenigk, J.; Arndt, H. (2002): Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. Antonie van Leeuwenhoek 81, 465-480
- /8/ Brown, P.; Wolfe, G. (2006): Protist Genetic Diversity in the Acidic Hydrothermal Environments of Lassen Volcanic National Park, USA. Journal of Eukaryotic Microbiology 53, 420-431
- /9/ Curds, C. (1973): The role of protozoa in activated sludge processes. American Zoologist 13, 161 - 169
- /10/ Güde, H. (1979): Grazing by Protozoa as Selection Factor for activated Sludge Bacteria. Microbial Ecology 5, 225 - 237
- /11/ Guillard, R. R. L.; Lorenzen, C. J. (1972): Yellow-green algae with chlorophyllide c.. Journal of Phycology 8, 10-14
- /12/ Jürgens, K.; Matz, C. (2002): Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 81, 413-434
- /13/ Jiang, L.; Krumins, J. A. (2006): Consumer vs. environmental productivity control of bacterial diversity and bacteria-mediated organic matter decomposition. Oikos 114, 441-450
- /14/ Lindemann R. (1942): The trophic-dynamic aspect of Ecology. Ecology Volume 23, 399-417
- /15/ Matz, C.; Boenigk, J.; Arndt, H.; Jürgens, K. (2002): Role of bacterial phenotypic traits in selective feeding of the heterotrophic nanoflagellate *Spumella* sp.. Aquatic Microbial Ecology 27, 137-148
- /16/ Nelson, D.; Marley, N. (1982): The biology and ecology of lotic Tardigrada. Freshwater Biology 44, 03-108
- /17/ Pascher, A. (1942): Zur Klärung einiger gefärbter und farblosier Flagellaten und ihrer Einrichtung zur Aufnahme animalischer Nahrung. Archiv für Protistenkunde 96, 75-108
- /18/ Weitere, M.; Arndt, H. (2002): Water discharge-regulated bacteria-heterotrophic nanoflagellate (HNF) interactions in the water column of the river rhine. Microbial Ecology 44, 19-29

ZUSAMMENFASSUNG

Protozoen werden bereits seit vielen Jahren in Belebungsanlagen städtischer Klärwerke zur biologischen Aufbereitung von sanitären Abwässern als Bakterienkonsumenten eingesetzt. Bei den hier vorgestellten Arbeiten wurden die Einsatzmöglichkeiten ausgewählter Protozoenarten in einer erweiterten biologischen Reinigungsstufe im Anschluss an eine kombinierte anaerobe/aerobe Prozesswasseraufbereitung am Beispiel der Altpapier verarbeitenden Industrie untersucht. Prägend für die Umweltbedingungen in den jeweiligen Belebungsbecken ist, neben den für die Papierfabrik typischen Belastungsmerkmalen wie organische Fracht, ein hoher Härtegrad, sowie erhöhter Salzgehalt oder schwankende pH-Werte und die hohe Temperatur von bis zu 40°C und darüber. Diese Temperaturerhöhung ergibt sich aus der vorangegangenen, anaeroben Behandlungsstufe (MTS), die aufgrund des metabolischen Optimums der eingesetzten methanogenen Bakterien bei $\geq 45^\circ\text{C}$ betrieben wird. Somit ist die erste Voraussetzung für Protozoen, die als alternatives, bakterielles Flockungsmittel zum Einsatz kommen sollen, eine Temperaturtoleranz von 40°C.

Abschnitt 1 der Arbeit befasste sich mit dem Vorkommen und den Charakteristika verschiedener Ciliatentaxa, die neben den hohen Belastungsgraden an chemischem Sauerstoffbedarf (178 - 2000 mg/l) und Calciumgehalt (220 - 600 mg/l), Temperaturen von bis zu 42°C widerstanden. Dabei zeigte sich, dass viele der vorgefundenen Morphospezies bei wesentlich höheren Temperaturen vorgefunden wurden, als ursprünglich aus der Literatur bekannt war. Zusätzlich ergab sich eine wesentlich größere Artenvielfalt, als ursprünglich angenommen. Im Anschluss an die vergleichenden autökologischen Untersuchungen zur maximalen und temporär tolerierbaren Temperatur ausgewählter Ciliaten-Morphospezies aus Belebung und Freiland, wurde das Spektrum auf die heterotrophen Flagellaten ausgeweitet. Heterotrophe Nanoflagellaten sind als Hauptbakterienkonsumenten ein wesentlicher Bestandteil im Stofffluss des mikrobiellen Nahrungsgewebes und tragen wesentlich zur Bakterienelimination in Klärbecken bei. In den Belebtschlammproben wurden ebenfalls Vertreter der Jakobiden (*Histiona sp.*) gefunden, die

morphologisch mit Vertretern aus dem Freiland identisch waren, jedoch in der Temperaturtoleranz signifikante Unterschiede aufwiesen. Molekularbiologische Untersuchungen konnten bisher noch keinen definitiven Aufschluss darüber geben, ob es sich hierbei um eine neue Art oder Unterart handelte, noch worin die thermale Anpassung bestand. Sie gaben jedoch Anlass zu der Vermutung, dass diese Anpassung in Folge der Synthese von spezifischen Heat Shock Proteinen, die in ihrer speziellen Eigenschaft die Struktur essentieller metabolischer Enzyme erhielten und eine Denaturierung verhinderten, entstanden war.

Die hohe Temperaturtoleranz zahlreicher Protozoenarten sollte auch bei hohen Temperaturen einen Einsatz in einer zusätzlichen aeroben Reinigungsstufe unter Berücksichtigung von Energieeinsparung ermöglichen. Kurze Generationszeiten, eine Verbreitung über Enzystierung, spezifische ortsgebundene Anpassung mit abweichenden Geno- und Ökotypen tragen wesentlich zu dem Modellcharakter von Protozoen. Sie ermöglichen Untersuchungen zur Mikroevolution und adaptiven Prozessen.

Abschnitt 2 befasste sich mit den Reinigungsstufen der Wasseraufbereitung, die einer erweiterten Trägerbiologie vorgeschaltet waren. Neben der organischen Belastung führten in erster Linie anorganische Frachten wie z.B. Kalzium und Chloride zu Kalkablagerungen und Korrosion an verschiedenen Stellen der Kreislaufwasserbehandlung. Durch Anlagerung von Kalzium sedimentierte Biomasse und wurde aus der aktiven Reinigung ausgeschleust. Die Folge war eine geringe Wiederverwendungsquote des Prozesswassers und zahlreiche Reinigungsstillstände. Im Anschluss an eine anaerobe Behandlung, in der durch methanogene Bakterien bei 45°C ein Großteil der organischen Fracht eliminiert werden konnte, wurde mit Hilfe der aeroben zyklischen Enthärtung (AZE) das Kalzium aus dem System ausgeschleust und somit die Umweltbedingungen geschaffen, die eine zusätzliche biologische Aufbereitung in Form von thermal angepasster Protozoen ermöglichten. Durch die Integration des Enthärtungsverfahrens und einer Rezirkulation konnte die thermophile Anaerobstufe (MTS), ohne für die Methanbakterien und die Trägerbiologie gefährlichen

CaCO₃-Ausfällungen, im optimalen pH-Bereich betrieben werden. Im Anschluss an das Aerobe Zyklische Enthärtungsverfahren sollte die Prozesswasserbehandlung durch gezielten Einsatz thermophiler Protozoen unterstützt werden. Die Versuchsarten *Histiona sp.*, *Oxytricha longa* und *Cyclidium glaucoma* wurden aus einer Belebungsanlage eines Indirekteinleiters bei einer Temperatur von $\leq 40^{\circ}\text{C}$ isoliert und kultiviert. Hierbei ergaben die Untersuchungen zum Einfluss auf die Bakteriengemeinschaft, dass sich unter der Anwesenheit von heterotrophen Nanoflagellaten (*Histiona sp.*) vor allem die Abundanz der Bakterienaggregate und der darin gebundenen Bakterien stark steigerte. Dies hatte eine Erhöhung des sedimentierbaren organischen Materials zur Folge. Untersuchungen zu der Entwicklung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) ergaben über einen Zeitraum von 6 Tagen bei einer reinen Sauerstoffbegasung einen nahezu stabilen CSB-Wert, während unter Anwendung ausgewählter Ciliatenarten eine CSB-Reduktion um über ein Drittel erzielt werden konnten. Daraus ergab sich, dass neben den Eliminationsraten von bis zu 95% für Calcium und 86% für den CSB, den MTS und AZE erzielten, eine erweiterte Trägerbiologie den CSB um ein weiteres Drittel reduzieren könnte.

Innerhalb der Prozesswasserkreislaufschließung ließe sich eine erweiterte Trägerbiologie durch Bakterienkonsumption und Ausflockung mittels ausgewählter Protozoenarten auf die bisher übliche Verwendung von Bioziden, Halogenverbindungen und chemischen Flockungsmittel verzichten. Durch ihre thermale Anpassung würde dabei eine Reinigung auch bei hohen Prozesswassertemperaturen ermöglicht. Bisher wurden in Papierfabriken entweder Kühltürme oder offene Belebungsanlagen installiert, um die Temperatur für eine aerobe biologische Behandlung herabzukühlen. Der wesentliche Nachteil besteht darin, dass die Papierproduktion eine Prozesswassertemperatur von $>50^{\circ}\text{C}$ voraussetzt, was wiederum einen immensen Energieaufwand zur Beheizung mit sich bringt. Zusätzlich führen exponierte Anlagen häufig zu einer Geruchsbelästigung. Die zuvor beschriebene Behandlung mit MTS, AZE und Trägerbiologie ist in Zukunft in Form eines

vollständig geschlossenen Wasserkreislaufes in einem gekapselten System mit Abluftfiltern vorgesehen.

ABSTRACT

Protists have been commonly used in the activated sludge basins of municipal wastewater treatment. Their characteristic as substantial bacterial consumers assisted the biological wastewater treatment for many years. In this study, the possible applications of chosen protozoan species in an additionally biological treatment were investigated. It was intended to insert the tertiary treatment subsequent to a combined anaerobe/aerobe treatment into a circular wastewater purification process. The field of investigation was the paper producing industry using recovered paper. Additionally to the typical organic pollution, high water hardness, high salinity, fluctuating pH-values and high temperatures of 40°C and above form the basic environmental conditions within the activated sludge basin. The high temperature is the consequence of the operation temperature of the Meta Term System (MTS), which is estimated at $\geq 45^\circ\text{C}$. The temperature is installed according to the metabolic optimum of the methane producing bacteria, which reduce the organic content in exchange for biogas. The use of protists as an alternative, non-chemical flocculant would therefore require a tolerance towards high temperatures up to 40°C.

The first chapter deals with the occurrence and the characteristics of various protist taxa, which were able to sustain a high chemical oxygen demand (COD) (178 - 2000 mg/l), strong Calcium contents (220 - 600 mg/l) and high temperatures up to 42°C. Many indicated morphospecies were found at much higher temperatures than previously known from literature. Additionally a much higher biodiversity was found than previously assumed. Subsequent to the comparative studies of selected ciliate morphospecies from thermal wastewater and the field regarding their maximum and the temporarily tolerable temperature, investigations were enlarged to the heterotrophic nanoflagellates (HNF). As general bacterial consumers, heterotrophic nanoflagellates play an essential role in the carbon flow of the microbial food web and contribute essentially to the bacterial elimination in activated sludge basins. Activated sludge samples revealed a representative of the Jakobids (*Histiona sp.*), which did not show differences in morphology, but differed greatly in

temperature tolerance from morphologically identical individuals from natural habitats. Molecular investigations did not provide an explicit solution, if the representatives from the thermal wastewater were an own new species or subspecies, or how this adaptation was achieved. But they lead to the assumption, that it was related to the synthesis of specific heat shock proteins (HSP). Heat shock proteins preserve the three dimensional structure of metabolic enzymes and avoid their denaturation.

The high temperature tolerance of various protist species should allow an application in an additional aerobe treatment component under high temperatures, considering energy conservation. Short generation times, a distribution via cysts, specific local adaptations with diverging geno- and ecotypes make protists ideal model organisms for the study of microevolution and adaptation processes.

The second chapter deals with the compartments of the circular wastewater treatment, which are supposed to be installed in front of the additional biological treatment. Along with the organic pollution, the anorganic content, for instance Calcium and Chloride, are responsible for corrosion. By the adsorption of Calcium, biomass sediments and is excluded from the purification process. This results in a low rate of reused processing water and multiple cleaning shutdowns. The first, anaerobe compartment (Meta Therm System, MTS) consists of methanogenic bacteria, which eliminate a large amount of the organic pollution at a temperature of 45°C. The aerobe treatment uses an aerobe circular softening (AZE), which excludes Calcium from the wastewater and provides the environmental conditions for additional biological treatment based on thermally adapted protists. With the help of the aerobe circular softening and an integrated recirculation the thermophile anaerobe treatment (MTS) was operated under optimal pH-values and without the risk of CaCO₃-precipitation. Calcium carbonate precipitation would lead to deactivation of the methanogenic bacteria and the biomass within the additional biological treatment. The additional compartment was intended to be operated with chosen protist species. *Histiona* sp., *Oxytricha longa* and *Cyclidium glaucoma*, which were tested, were isolated from the

activated sludge basin of an indirect discharger paper mill and cultivated at temperatures up to 40°C. Studies of bacterial growth response in presence of a bacterivour predator, (heterotrophic nanoflagellate, *Histiona sp.*) showed a high increase of abundance of the bacterial aggregates and the integrated bacteria. The conclusion was that more organic material which could sedimate. Studies of the COD development showed different effects depending on the way of treatment. Previously anaerobically treated wastewater kept an approximately stable COD with a mere oxygen supply. An addition specific Ciliate species the COD was reduced for more than one third over a period of 6 days. This lead to the conclusion that the meta therm system (MTS) and the aerobe circular softening (AZE), which eliminated up to 95% of the calcium content and reduced the chemical oygen demand by 86%, can be supported by an additional biological treatment with an efficiency of more than one third COD.

Efforts to establish a completely closed circular wastewater treatment with a recovery rate of 100% could advance by the use of thermally adapted protists. As bacterial consumers and non chemical flocculants they could reduce the use of halogen compounds and biocides. To this day, cooling towers and open sludge basins were installed in paper mills in order to cool down the water temperature for further biological treatment. For reinsertion into the production process, the water had to be heated up to 50°C again. The thermal adaptation enabled a biological treatment at high temperatures, which would make a cooling unnecessary and save high energy costs. Additionally open activated sludge basins often led to smell nuisance. A combined anaerobe/aerobe treatment of meta therm system, aerobe circular softening and additional biological treatment could be established in a closed system with exhaust air purification.

The potentially high temperature tolerance of several protists would make them accessible to an additional thermal aerobic water treatment saving energy. Short generation times, distributions via cysts, specific local adaptations along with divergent genotypes and

ecotypes, make protists good model organisms to study microevolution and adaptation processes.

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Hartmut Arndt betreut worden.

Grischa Peter Feuersänger

TEILPUBLIKATIONEN

Althöfer P., Feuersänger G.-P. (2005): Thermophile Anaerobe Circuit Water Treatment with Integrated Softening AZE®. *Professional Papermaking*, 2: 56-60

Althöfer P., Feuersänger G.-P. (2005): Thermophile anaerobe Kreislaufwasserbehandlung mit integrierter Enthärtung AZE®. *Wasserwirtschaft Wassertechnik*, 9: 25-30

Althöfer P., Feuersänger G.-P. (2006): Zum Einleiten zu wertvoll, Wiederverwendung von Biowasser. *Wasserwirtschaft Wassertechnik*, 9: 1-4

Althöfer P., Feuersänger G.-P. (2007): Wiederverwendung von „Biowasser“ – Polyacrylamide unterstützen Beste Verfügbare Technik-Kandidat: Aerobe Zyklische Entkarbonisierung. *Wasserwirtschaft Wassertechnik*, 9: 16-19 ; *Wochenblatt für Papierfabrikation*, 2010: 1-4

Feuersänger G.-P., Althöfer P., Arndt H.A. (2008): Reinigungsleistungen und Einsatzmöglichkeiten thermotoleranter Protozoenarten in der thermalen biologischen Wasseraufbereitung. *Wasserwirtschaft Wassertechnik*, 9: 32-40

Feuersänger G.-P., Nitsche F., Arndt H. (2008): High thermal tolerance of protists appearing in heated wastewater. (subm.)

Feuersänger G.-P., Nitsche F., Arndt H. (2008): Autecological comparison of jakobid morphospecies (heterotrophic flagellates)-isolates from natural and thermal wastewater and their phylogenetic relationship. (subm.)

CURRICULUM VITAE

Geburtsdatum: 07. Januar 1976
Geburtsort: Weymouth/MA, USA
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Mittelstrasse 26
53819 Neunkirchen-Seelscheid
Telefon: +49 177 2588651
E-Mail: Grischa_F@yahoo.de
G_Feuersaenger@yahoo.de

AUSBILDUNG

09/1987– **Antoniuskolleg** (privates Gymnasium), Neunkirchen-Seelscheid, Deutschland.
06/1995: Allgemeine Hochschulreife, Abschlussnote 1.9, Leistungskurse Biologie und Englisch.
10/1995– **Luftwaffenausbildungsregiment**, Büdel, Niederlande.
09/1996: Grundausbildung.
Amt für Studien und Übungen, Waldbröl, Deutschland.
Materialbeschaffung.
Bundesministerium der Verteidigung, Bonn–Hardtberg, Deutschland.
Übungsplanung von Einsätzen.
10/1996– **Rheinische Friedrich-Wilhelm Universität**, Bonn, Deutschland.
02/2003: Dipl. Biol., Vertiefungsrichtung *Ökologie*, Abschlussnote 2.1, Diplomarbeit: „Flughafen Köln/Bonn und Wahner Heide, Auswirkungen landschaftspflegerischer Maßnahmen auf die Avifauna“ (Note 1.7).
seit **Universität zu Köln** (Institut für Allgemeine Ökologie und Limnologie), Köln, Deutschland.
01/2006: Promotion zum Dr. rer. Nat. im Bereich Biologie/Biotechnologie, Dissertation: „Isolation, Charakterisierung und Einsatzmöglichkeiten von thermophilen Protozoen für umweltschonende Abwasseraufbereitung in Prozesswasserkreislaufsystemen“.

BERUFLICHER WERDEGANG

08/2000– **Flughafen Köln/Bonn GmbH** (Abteilung Technik und Umwelt), Köln, Deutschland.
02/2001: Technischer Umweltschutz: Wassermanagement, Flughafenausbauplanung inklusive notwendiger Kompensationsmaßnahmen, rechtliche Grundlagen.
09/2000: **Université Pierre et Marie Curie (UPMC)** (Observatoire Océanologique), Banyuls sur Mer, Frankreich.
„Gravitational Biology“: Experimente zu einzelligen Organismen und deren Verhalten in der Schwerelosigkeit.
04/2001: **Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich** (Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz (EAWAG)), Luzern, Schweiz.
Experimente im Bereich Süßwasserökologie.
05/2001: **Université Pierre et Marie Curie (UPMC)** (Observatoire Océanologique), Banyuls sur Mer, Frankreich.
Experimente im Bereich Salzwasserökologie.
03/2003– **Universität zu Köln** (Institut für Allgemeine Ökologie und Limnologie), Köln, Deutschland.
01/2005: Wissenschaftlicher Mitarbeiter.
seit **Aerocycle Ltd.** (patentierte, weltweit einzigartige Verfahrenstechniken zur Prozesswasserbehandlung), Köln, Deutschland.
01/2005: Wasseranalytik in Prozesswasserkreislaufsystemen. Projektarbeit zur Etablierung geschlossener Wasserkreislaufsysteme mit internationalen Kooperationspartnern (u.a. Smurfit Kappa).

MITGLIEDSCHAFTEN

DBU: Deutsche Bundesstiftung Umwelt.

AUSZEICHNUNGEN UND STIPENDIEN

Promotionsstipendium bei der **Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU)**.